



**Escola Nacional
de Saúde Pública**

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no
carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo**

Doutoramento em Saúde Pública

Especialidade de Epidemiologia

Jorge Manuel Trindade Rebola

JUNHO 2019



**Escola Nacional
de Saúde Pública**

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo

Tese elaborada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Saúde Pública, especialidade de Epidemiologia, realizada sob a orientação científica de:

- Prof. Doutor Pedro Aguiar
Escola Nacional de Saúde Pública
Universidade Nova de Lisboa
- Prof. Doutor Antonio Lopez-Beltran
Universidade de Córdoba
Fundação Champalimaud, Lisboa

JUNHO 2019

À Amélia, ao Jorge e à Sofia

Resumo



Resumo

Introdução: O carcinoma urotelial da bexiga constitui um importante problema de Saúde Pública pela sua incidência e prevalência, ocupando o segundo lugar entre as neoplasias urológicas e situando-se entre as dez neoplasias mais frequentes. A avaliação histopatológica do tecido tumoral continua a ser *gold standard* na fase do diagnóstico e têm profundas implicações no tratamento e no prognóstico da doença. No entanto, os fatores de prognóstico clássicos apresentam limitações preditivas a nível individual num tempo em que a medicina personalizada surge como o paradigma para os próximos anos. É particularmente importante, na área oncológica, a integração de biomarcadores moleculares com capacidade de estabelecer prospectivamente a agressividade, a probabilidade de recorrência, o risco de progressão da doença e precisar o prognóstico e tratamento personalizados.

Materiais e métodos: O projeto de investigação tem por base um estudo observacional retrospectivo de uma coorte clínica constituída por 147 doentes com o diagnóstico de carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1) recrutados no Hospital Reina Sofia em Córdoba entre 2002 e 2014. Foram avaliados fatores de prognóstico clínico-patológicos e a expressão de biomarcadores moleculares relativamente aos *outcomes* no final do período de seguimento. Estudamos a expressão do Ki-67, p53, p21, p27, ciclina D1 e ciclina D3, Bax, Bcl-2, caspase 3, ErbB-2, CD 44, CK 5/6 e CK 20. Com base na expressão de CK 5/6 e CK 20 desenvolvemos um classificador de fenótipo molecular com quatro fenótipos: Nulo (CK5/6-, CK20-), Misto (CK5/6+, CK20+) Basal (CK5/6+, CK20-) e Luminal (CK5/6-, CK20+). Os resultados de interesse primário para o estudo são a recorrência e o tempo até à primeira recorrência da doença, a progressão e o tempo até à progressão da doença, a ocorrência de morte específica pela doença e o tempo até à ocorrência da morte específica da doença.

Resultados: Dos 147 doentes incluídos no estudo com um período de seguimento mediano de 76 meses, 17 do sexo feminino e 130 do sexo masculino com uma mediana de idades de 68 anos. Cerca de 75% (n=110) dos tumores foram classificados Ta (AJCC/TNM 2016) e 65% (n=95) eram tumores de alto grau (OMS 2004/2016). Na análise multivariável, são fatores de prognóstico independentes na recorrência o grau histológico (HR: 3,005) e o fenótipo luminal (HR: 2,307); são fatores independentes de progressão tumoral o grau histológico (HR: 10,245), a ciclina D3 (HR: 4,476), Bax (HR: 0,155), Bcl2 (HR: 0,289), o fenótipo basal (HR: 6,271) e o fenótipo luminal (HR: 15,981). Relativamente à morte específica da doença são fatores de prognóstico independentes o diâmetro do tumor (HR 5,134), o grau histológico (HR: 11,635), o Bax (HR: 0,062), Bcl2 (HR: 0,280), o fenótipo basal (HR: 7,881) e fenótipo luminal (HR: 24,893).

Conclusões: O nosso estudo mostra que a graduação do fenótipo molecular é viável e estratifica os doentes com CUBNMI em categorias prognósticas potencialmente preditivas de recorrência, progressão e morte específica pela doença, particularmente nos tumores de alto grau.

Palavras-chave: Carcinoma urotelial; biomarcador molecular; fator preditivo; fenótipo molecular; recorrência; progressão; morte específica

Abstract

Introduction: Urothelial bladder cancer is a public health issue, due to its incidence and prevalence. It is the second most common urological malignancy and it is amongst the 10 more common tumors worldwide. Pathology evaluation is the gold standard for establishing diagnosis and has important treatment and prognosis implications. Nevertheless, histology has predictive drawbacks. Personalized medicine might be a path to overcome them, namely using molecular biomarkers, to highlight disease aggressiveness, recurrence probability and prognosis, thus providing the basis for individualized treatment.

Materials and methods: In a retrospective clinical cohort study, we evaluated 147 consecutive patients, with non-invasive (“pTa” and “pT1”) urothelial bladder carcinoma (NMIBC), treated at the Urology Service from Hospital Reina Sofia in Cordoba, between 2002 and 2014. The diagnosis was established by pathology. Several clinical, pathological and molecular biomarkers (Ki-67, p53, p21, p27, cyclin D1, cyclin D3, Bax, Bcl-2, caspase-3, CD44, CK5/6 and CK 20) were evaluated. In order to further refine the predictive impact of molecular biomarkers, we created a “molecular phenotype classifier” based on CK 5/6 and CK 20 expression (“Null: CK5/6-, CK20-”; “Mixed: CK5/6+, CK20+”; “Basal: CK5/6+, CK20-”; and “Luminal: CK5/6-, CK20+”). The study outcomes were disease recurrence, time to first disease recurrence, progression, time to progression, disease-specific mortality and time to disease-related death.

Results: In our sample there were 17 females and 130 males. The median age was 68 years. Around three quarters (n=110) were classified as “pTa” (AJCC/TNM 2016) and 65% (n=95) as “high-grade” (WHO 2004/2016). In multivariable analysis, both histological grade (HR=3.005) and “Luminal” phenotype (HR=2.307) were independent predictive factors for disease recurrence. Histological grade (HR=10.245), cyclin D3 (HR=4.406), BAX (HR=0.155), Bcl-2 (HR=0.289), “Basal” phenotype (HR=6.271) and “luminal” phenotype (HR=15.981) were all independent predictive factors for disease progression. Tumor size (HR=5.134), histological grade (HR=11.635), Bax (HR=0.062), Bcl-2 (HR=0.280), “Basal” phenotype (HR=7.881) and “Luminal” phenotype (HR=24.893) were all independent predictive factors for disease-specific mortality.

Conclusions: Our study shows that using this “phenotypic classifier” is feasible and accurately stratifies NMIBC patients, according to disease recurrence, disease progression and disease-specific mortality, namely in high-grade tumors.

Keywords: Urothelial carcinoma, molecular biomarker, molecular phenotype, recurrence, progression and disease-specific mortality

Agradecimentos

Agradecimentos

Antes de mais, quero agradecer à minha família a tolerância e apoio incondicional durante os períodos em que a exigência do trabalho se sobrepôs à necessidade de estar presente.

Agradeço ao Senhor Professor Antonio Lopez-Beltran que, tão generosamente, disponibilizou o seu tempo e o seu saber para tornar possível o desenvolvimento desta Tese de Doutoramento. A marca que deixa permanecerá muito para além deste trabalho.

Agradeço ao Senhor Professor Pedro Aguiar a disponibilidade permanente, o apoio e a forma crítica, exigente e formativa na orientação da Tese. As suas orientações e comentários contribuíram definitivamente para que este trabalho atingisse o seu objetivo.

Ao Dr. Nuno Vau agradeço a amizade e o apoio crítico incondicional sempre presente nas nossas inúmeras conversas e que moldaram este trabalho.

Agradeço ao Dr. José Alvarez, urologista do serviço de urologia do Hospital Reina Sofia em Córdoba e à Dra. Ana Blanca do Instituto de Investigación Biomédica de Córdoba a colaboração no desenvolvimento do projeto de investigação que serviu de suporte à Tese.

Agradeço à Administração da Fundação Champalimaud, ao Professor António Parreira, Diretor Clínico da Fundação Champalimaud e ao Dr. Jorge Fonseca, Diretor da Unidade de Urologia, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Dra. Manuela Seixas, Diretora da Unidade de Investigação Clínica da Fundação Champalimaud, o seu contributo para a realização do presente estudo.

Finalmente, agradeço a todos os que estiveram presentes na minha vida e me acompanharam, contribuindo para a concretização deste trabalho.

Abreviaturas, siglas e acrónimos

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

De forma a simplificar a escrita e a leitura deste documento, algumas nomenclaturas são referidas em termos de abreviaturas. A primeira menção é sempre feita com a designação completa, seguida da sigla ou do acrónimo que lhe corresponde entre parêntesis.

AG - Alto Grau (carcinoma ureteral)

ASR - Incidência padronizada por idade

BG - Baixo Grau (carcinoma uretral)

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CB - Cancro da bexiga

CDKs - Cyclin-Dependent Protein kinases

CNPD - Comissão Nacional de Proteção de Dados

CUB - Carcinoma Urotelial da bexiga

CUBMI - Carcinoma urotelial da bexiga músculo-invasivo

CUBNMI - Carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo

CUETO - Clube Urológico Espanhol de Tratamento Oncológico

DGS - Direção-Geral da Saúde

EAU - Associação Europeia de Urologia

EORTC - European Organization for Research and Treatment of Cancer

HER2 - Human Epidermal Growth Factor 2

HR - Hazard Ratio

IARC - International Agency for Research on Cancer

IC - Intervalo de confiança

IDH - Índice de Desenvolvimento Humano

IHQ – Imunohistoquímica

ISUP - Sociedade Internacional de Patologia Urológica

NBI - Narrow-Banding Imaging

NPUBPM - Neoplasia papilar urotelial de baixo potencial maligno

OMS - Organização Mundial de Saúde

RNA_m - RNA mensageiro

RTU-V - Ressecção Transuretral de Tumor Vesical

Ta - Tumor sem invasão da lâmina própria

T1 - Tumor com invasão da lâmina própria

TCGA - Cancer Genome Atlas Project

TNM - Estadiamento: Tumor, Invasão ganglionar, Metástases

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

Índice



ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	XV
ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS.....	XIX
ÍNDICE.....	XXIII
ÍNDICE DE TABELAS	XXXI
ÍNDICE DE FIGURAS	XXXVII
ÍNDICE DE QUADROS	XLV
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 - EPIDEMIOLOGIA DO CANCRO DA BEXIGA.....	7
2.2 - FATORES DE RISCO.....	15
2.2.1 - Fatores endógenos: genética e hereditariedade	16
2.2.2 - Fatores exógenos.....	17
2.2.2.1 - Tabaco.....	17
2.2.2.2 - Exposição ocupacional.....	18
2.2.2.3 - Exposição ao arsénio	19
2.2.2.4 - Radiações ionizantes e condições médicas	20
2.3 - ANATOMIA E FISILOGIA DA BEXIGA	21
2.4 - CICLO CELULAR E CANCRO	22
2.5 - CARCINOGENESE UROTELIAL	25
2.6 - CLONALIDADE E CÉLULA DE ORIGEM	29
2.7 - CLASSIFICAÇÃO DO CARCINOMA UROTELIAL DA BEXIGA	29
2.7.1 - Classificação histológica e estadiamento	29
2.7.2 - Classificação molecular do carcinoma urotelial.....	38
2.8 - ASPETOS CLÍNICOS	39
2.9 - TRATAMENTO.....	40
2.10 - RECORRÊNCIA E PROGRESSÃO	43
2.11 - BIOMARCADORES MOLECULARES	47
2.11.1 - Marcadores de proliferação celular.....	49
2.11.1.1 - Ki-67/PCNA	49
2.11.2 - Marcadores do ciclo celular	51
2.11.2.1 - RB/pRB.....	51

2.11.2.2 - TP-53 / p53.....	52
2.11.2.3 - p21	52
2.11.2.4 - p27	53
2.11.2.5 - Ciclinas D1 e D3.....	53
2.11.3 - Modeladores da apoptose.....	54
2.11.3.1 - Bcl-2.....	54
2.11.3.2 - Bax.....	55
2.11.3.3 - Caspase - 3	55
2.11.4 - Fatores de transdução de sinal e crescimento celular	56
2.11.4.1- ErbB-2/HER-2.....	56
2.11.5 - Marcadores de diferenciação celular	56
2.11.5.1 - CD44.....	56
2.11.5.2 - CK 5/6 e CK 20.....	57
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS DE INVESTIGAÇÃO	61
3.1 - HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO	61
3.2 - OBJETIVOS DE INVESTIGAÇÃO	61
3.2.1 - Objetivos gerais.....	61
3.2.2 - Objetivos específicos	62
4. MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO DOS DOENTES NO ESTUDO	68
4.2 - PROCEDIMENTOS	69
4.3 - VARIÁVEIS INDEPENDENTES	71
4.4 - VARIÁVEIS DEPENDENTES	82
4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
4.6 - PLANO DE OPERACIONALIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	87
4.7 - QUESTÕES ÉTICAS.....	90
5. RESULTADOS	93
5.1 - CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA DOS DOENTES	93
5.2 - VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS NA “BASELINE”	94
5.3 - EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES	95
5.4 - ANÁLISES DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES	97
5.4.1 - Recorrência Tumoral.....	98
5.4.2 - Progressão tumoral	99
5.4.3 - Morte específica da doença	101

5.5 - ANÁLISE DOS FATORES DE PROGNÓSTICO NOS RESULTADOS DA RECORRÊNCIA	
TUMORAL	103
5.5.1 - Análise dos fatores de prognóstico sociodemográficos nos resultados da	
recorrência tumoral	103
5.5.1.1 - Idade	103
5.5.1.2 - Sexo	105
5.5.2 - Análise dos fatores de prognóstico clínico-patológicos nos resultados da	
recorrência tumoral	106
5.5.2.1 - Diâmetro tumoral	106
5.5.2.2 - Estádio	108
5.5.2.3 - Grau do Tumor	109
5.5.3 - Análise da expressão dos biomarcadores moleculares nos resultados da	
recorrência tumoral	111
5.5.3.1 - Ki-67	111
5.5.3.2 - p53	112
5.5.3.3 - p21	114
5.5.3.4 - p27	115
5.5.3.5 - Ciclina D1	117
5.5.3.6 - Ciclina D3	118
5.5.3.7 - Bax	120
5.5.3.8 - Bcl-2	121
5.5.3.9 - Caspase 3	123
5.5.3.10 - CD 44	124
5.5.3.11 - ErbB-2/HER2	126
5.5.3.12 - CK 5/6	127
5.5.3.13 - CK 20	129
5.5.3.14 - Fenótipo Molecular	130
5.5.4 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico nos resultados da	
recorrência tumoral	134
5.6 - ANÁLISE DOS FATORES DE PROGNÓSTICO NOS RESULTADOS DA PROGRESSÃO	
TUMORAL	135
5.6.1 - Análise dos fatores de prognóstico sociodemográficos nos resultados da	
progressão tumoral	135
5.6.1.1 - Idade	135
5.6.1.2 - Sexo	137
5.6.2 - Análise dos fatores de prognóstico clínico-patológicos nos resultados da	
progressão tumoral	138

5.6.2.1 - Diâmetro tumoral.....	138
5.6.2.2 - Estádio.....	140
5.6.2.3 - Grau histológico.....	141
5.6.3 - Análise da expressão dos biomarcadores moleculares nos resultados da progressão tumoral.....	143
5.6.3.1 - Ki-67.....	143
5.6.3.2 - p53.....	144
5.6.3.3 - p21.....	146
5.6.3.4 - p27.....	147
5.6.3.5 - Ciclina D1	148
5.6.3.6 - Ciclina D3	150
5.6.3.7 - Bax.....	151
5.6.3.8 - Bcl-2.....	153
5.6.3.9 - Caspase 3.....	154
5.6.3.10- CD 44.....	156
5.6.3.11 - ErbB-2/HER2.....	157
5.6.3.12 - CK 5/6.....	159
5.6.3.13 - CK 20.....	160
5.6.3.14 - Fenótipo Molecular	162
5.6.4 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico nos resultados da progressão tumoral.....	165
5.7 - ANÁLISE DOS FATORES DE PROGNÓSTICO NOS RESULTADOS DA MORTE ESPECÍFICA	166
5.7.1 - Análise dos fatores de prognóstico sociodemográficos nos resultados da morte específica.....	166
5.7.1.1 - Idade.....	166
5.7.1.2 - Sexo.....	168
5.7.2 - Análise dos fatores de prognóstico clínico-patológicos nos resultados da morte específica.....	169
5.7.2.1 - Diâmetro tumoral.....	169
5.7.2.2 - Estádio.....	171
5.7.2.3 - Grau histológico.....	172
5.7.3 - Análise da expressão dos biomarcadores moleculares nos resultados da morte específica.....	174
5.7.3.1 - Ki-67	174
5.7.3.2 - p53.....	175
5.7.3.3 - p21.....	177

5.7.3.4 - p27	178
5.7.3.5 - Ciclina D1	179
5.7.3.6 - Ciclina D3	181
5.7.3.7 - Bax.....	182
5.7.3.8 - Bcl-2.....	184
5.7.3.9 - Caspase 3.....	185
5.7.3.10 - CD 44.....	187
5.7.3.11 - ErbB-2/HER2.....	188
5.7.3.12 - CK 5/6.....	189
5.7.3.13 - CK 20.....	191
5.7.3.14 - Fenótipo Molecular	192
5.7.4 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico nos resultados da morte específica	195
5.8 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO DE COX MULTIVARIÁVEL.....	196
5.8.1 - Análise de regressão de Cox multivariável dos fatores de prognóstico na recorrência tumoral.....	196
5.8.2 - Análise de regressão de Cox multivariável dos fatores de prognóstico na progressão tumoral.....	198
5.8.3 - Análise de regressão de Cox multivariável dos fatores de prognóstico na morte específica.....	200
5.9 - SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO POSITIVO E VALOR PREDITIVO NEGATIVO DOS FATORES DE PROGNÓSTICO FACE ÀS VARIÁVEIS RESULTADO	202
5.10 - APLICAÇÃO CLÍNICA DOS BIOMARCADORES MOLECULARES	204
6. DISCUSSÃO.....	213
6.1 - FATORES SOCIODEMOGRÁFICOS	214
6.2 - FATORES ANATOMOPATOLÓGICOS CLÁSSICOS.....	215
6.2.1 - Dimensão tumoral	216
6.2.2 - Estádio.....	216
6.2.3 - Grau histológico.....	217
6.3 - BIOMARCADORES MOLECULARES.....	219
6.3.1 - Ki-67, biomarcador de proliferação celular	219
6.3.2 - Biomarcadores do ciclo celular	221
6.2.3 - Biomarcadores da apoptose	225
6.3.4 - ErbB-2/ HER2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2).....	227
6.3.5 - CD 44.....	228
6.2.6 - CK 5/6 e CK 20 na expressão do fenótipo molecular.....	229

6.4 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	233
7. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	237
8. BIBLIOGRAFIA.....	241
9. ANEXOS.....	265

Índice de tabelas



Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação da OMS do tumor urotelial	32
Tabela 2 - Classificação do Tumor Vesical TNM.....	36
Tabela 3 - Fatores de risco de recorrência e progressão baseado no sistema da EORTC	44
Tabela 4 - Probabilidade de recorrência e progressão baseado no sistema da EORTC	44
Tabela 5 - Fatores de risco de recorrência e progressão baseado no sistema da CUETO	45
Tabela 6 - Valores de <i>cutoff</i> para os biomarcadores de expressão nuclear e categorias de análise no estudo do carcinoma urotelial da bexiga	76
Tabela 7 - Valores de <i>cutoff</i> dos biomarcadores de expressão citoplasmática e de membrana celular no estudo do carcinoma urotelial da bexiga.....	80
Tabela 8 - Caracterização sociodemográfica (n = 147).....	93
Tabela 9 -Variáveis anatomopatológicas (n=147)	94
Tabela 10 - Estádio e Grau do Tumor (n=147).....	95
Tabela 11 - Expressão nuclear dos biomarcadores do ciclo celular (n=147)	96
Tabela 12 – Expressão citoplasmática/membranar dos biomarcadores (n=147)	97
Tabela 13 - Análise de Kaplan-Meier para a recorrência tumoral	98
Tabela 14 - Análise de Kaplan-Meier para a Progressão da doença	100
Tabela 15 - Análise de Kaplan-Meier para a morte específica pela doença	101
Tabela 16 - Análise de Kaplan-Meier da idade face à recorrência	104
Tabela 17 - Análise de Kaplan-Meier do sexo face à recorrência	105
Tabela 18 - Análise de Kaplan-Meier do diâmetro tumoral face à recorrência.....	107
Tabela 19 -Análise de Kaplan-Meier do Estádio face à recorrência.....	108
Tabela 20 - Análise de Kaplan-Meier do grau histológico relativamente à recorrência.....	110
Tabela 21 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ki-67 relativamente à recorrência	111
Tabela 22 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p53 relativamente à recorrência.....	113
Tabela 23 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p21 relativamente à recorrência.....	114
Tabela 24 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p27 relativamente à recorrência.....	116
Tabela 25 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D1 relativamente à recorrência	117

Tabela 26 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D3 relativamente à recorrência	119
Tabela 27 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à recorrência	120
Tabela 28 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bcl-2 relativamente à recorrência.....	122
Tabela 29 - Análise de Kaplan-Meier da expressão das caspases relativamente à recorrência	123
Tabela 30 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CD 44 relativamente à recorrência	125
Tabela 31 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de ErbB-2 relativamente à recorrência ...	126
Tabela 32 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 5/6 relativamente à recorrência....	128
Tabela 33 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 20 relativamente à recorrência.....	129
Tabela 34 - Análise de Kaplan-Meier da expressão fenotípica relativamente à recorrência	132
Tabela 35 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico face à recorrência tumoral	134
Tabela 36 - Análise de Kaplan-Meier da idade face à progressão	136
Tabela 37 - Análise de Kaplan-Meier do sexo face à progressão	137
Tabela 38 - Análise de Kaplan-Meier do diâmetro tumoral face à progressão	139
Tabela 39 - Análise de Kaplan-Meier do Estádio face à progressão	140
Tabela 40 - Análise de Kaplan-Meier do grau histológico relativamente à progressão	142
Tabela 41 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ki-67 relativamente à progressão	143
Tabela 42 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p53 relativamente à progressão.....	145
Tabela 43 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p21 relativamente à progressão.....	146
Tabela 44 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p27 relativamente à progressão.....	147
Tabela 45 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D1 relativamente à progressão	149
Tabela 46 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D3 relativamente à progressão	150
Tabela 47 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à progressão	152
Tabela 48 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bcl-2 relativamente à progressão	153
Tabela 49 - Análise de Kaplan-Meier da expressão da caspase 3 relativamente à progressão	155
Tabela 50 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CD44 relativamente à progressão	156

Tabela 51 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de C-ERB2 relativamente à progressão .	158
Tabela 52 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 5/6 relativamente à progressão....	159
Tabela 53 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 20 relativamente à progressão.....	161
Tabela 54 - Análise de Kaplan-Meier da expressão fenotípica relativamente à progressão	163
Tabela 55 - Resumo da análise bivariável face à progressão tumoral	165
Tabela 56 - Análise de Kaplan-Meier da idade face à morte específica.....	167
Tabela 57 - Análise de Kaplan-Meier do sexo face à morte específica.....	168
Tabela 58 - Análise de Kaplan-Meier do diâmetro tumoral face à morte específica.....	170
Tabela 59 -Análise de Kaplan-Meier do estágio face à morte específica.....	171
Tabela 60 - Análise de Kaplan-Meier do grau histológico relativamente à morte específica....	172
Tabela 61 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ki-67 relativamente à morte específica	174
Tabela 62 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p53 relativamente à morte específica	176
Tabela 63 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p21 relativamente à morte específica	177
Tabela 64 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p27 relativamente à morte específica	178
Tabela 65 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D1 relativamente à morte específica	180
Tabela 66 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D3 relativamente à morte específica	181
Tabela 67 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à morte específica	183
Tabela 68 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bcl-2 relativamente à morte específica	184
Tabela 69 - Análise de Kaplan-Meier da expressão das caspases relativamente à morte específica	186
Tabela 70 – Análise de Kaplan-Meier da expressão de CD44 relativamente à morte específica	187
Tabela 71 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de ErbB-2 relativamente à morte específica	188
Tabela 72 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 5/6 relativamente à morte específica	190
Tabela 73 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 20 relativamente à morte específica	191

Tabela 74 - Análise de Kaplan-Meier da expressão fenotípica relativamente à morte específica	193
Tabela 75 - Resumo da análise bivariável face à morte específica.....	195
Tabela 76 - Resumo dos fatores de prognóstico de maior relevância para a análise multivariável da recorrência.....	197
Tabela 77 - Análise de regressão múltipla de Cox para extração dos fatores de prognóstico mais relevantes para a recorrência tumoral	198
Tabela 78 - Resumo dos fatores de prognóstico de maior relevância para a análise multivariável da progressão.....	198
Tabela 79 - Análise de regressão múltipla de Cox para extração dos fatores de prognóstico mais relevantes para a progressão tumoral	199
Tabela 80 - Resumo dos fatores de prognóstico de maior relevância para a análise multivariável da morte específica	200
Tabela 81 - Análise de regressão múltipla de Cox para extração dos fatores de prognóstico mais relevantes para a morte específica.....	201
Tabela 82 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico mais relevantes para a recorrência tumoral	202
Tabela 83- Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico mais relevantes para a progressão tumoral	203
Tabela 84 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico mais relevantes para a morte específica da doença.....	204
Tabela 85 - Resumo dos fator de prognóstico independentes face aos <i>outcomes</i> do estudo .	205
Tabela 86 - Resumo da análise da expressão fenotípica molecular nos tumores de baixo grau face à recorrência, progressão e morte específica.....	206
Tabela 87 – Resumo da análise da expressão fenotípica molecular nos tumores de alto grau face à recorrência, progressão e morte específica.....	208

Índice de Figuras

Índice de Figuras

Figura 1 - Cancro da bexiga - incidência ajustada à idade no mundo.....	9
Figura 2 - Cancro da bexiga - mortalidade ajustada à idade no mundo.	10
Figura 3 - Cancro da bexiga - incidência e mortalidade ajustadas à idade e sexo nos países Europeus.....	11
Figura 4 – Mortalidade e taxa de mortalidade do Cancro da Bexiga em Portugal 2010-2014 ...	13
Figura 5 - Incidência do Cancro da Bexiga em Portugal em 2015 e estimativa para 2035	14
Figura 6 - Mortalidade do Cancro da Bexiga em Portugal em 2015 e estimativa para 2035.....	15
Figura 7 - Ciclo Celular.....	25
Figura 8 - Carcinogénese – Vias da carcinogénese do carcinoma urotelial	27
Figura 9 - Carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau	33
Figura 10 - Carcinoma urotelial de bexiga de alto grau	34
Figura 11- Carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1).....	35
Figura 12 - Classificação TNM do Carcinoma Urotelial da Bexiga -T.....	37
Figura 13 – Biomarcadores moleculares – relação com o ciclo celular	51
Figura 14 - Expressão dos biomarcadores com expressão nuclear.....	75
Figura 15 - Biomarcadores da apoptose com expressão citoplasmática	78
Figura 16 - Biomarcadores com expressão citoplasmática e de membrana	79
Figura 17 - Biomarcadores de expressão citoplasmática com padrão de distribuição "topográfico" anómalo (positivo).....	80
Figura 18 – Representação esquemática das diferentes fases de análise dos dados.....	86
Figura 19 - Curva de sobrevivência dos doentes face à recorrência da doença	99
Figura 20 - Curva de sobrevivência dos doentes face à progressão da doença	100
Figura 21 - Curva de sobrevivência dos doentes face à morte específica da doença.....	102
Figura 22 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com idade < 70 anos versus doentes com idade ≥ 70 anos face à recorrência	104
Figura 23 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do sexo masculino versus doentes do sexo feminino face à recorrência	106
Figura 24 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a dimensão tumoral	107

Figura 25 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com estágio Ta <i>versus</i> T1 face à recorrência.....	109
Figura 26 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com tumores de alto grau <i>versus</i> doentes com tumor de baixo grau histológico relativamente à recorrência	110
Figura 27 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de Ki-67	112
Figura 28 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de p53	113
Figura 29 - Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de p21.....	115
Figura 30 - Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de p27.....	116
Figura 31 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão da ciclina D1	118
Figura 32 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão da ciclina D3.....	119
Figura 33 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de Bax.	121
Figura 34 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de Bcl-2.	122
Figura 35 - Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência na análise da expressão tumoral da caspase 3	124
Figura 36 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de CD44	125
Figura 37 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de ErbB-2.	127
Figura 38 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de CK 5/6.	128
Figura 39 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de CK 20	130
Figura 40 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando o Fenótipo molecular	133
Figura 41 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com idade < 70 anos <i>versus</i> doentes com idade ≥ 70 anos face à progressão	136
Figura 42 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do sexo masculino <i>versus</i> doentes do sexo feminino face à progressão.	138

Figura 43 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a dimensão tumoral	139
Figura 44 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com estágio Ta <i>versus</i> T1 face à progressão.....	141
Figura 45 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com tumores de alto grau <i>versus</i> doentes com tumor de baixo grau histológico relativamente à progressão	142
Figura 46 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão do Ki-67	144
Figura 47 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de p53	145
Figura 48 - Comparação entre curvas de sobrevivência à progressão considerando a expressão de p21.....	147
Figura 49 -Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência considerando a expressão de p27.....	148
Figura 50 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão da ciclina D1	149
Figura 51 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão da ciclina D3.....	151
Figura 52 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de Bax.	152
Figura 53 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de Bcl-2	154
Figura 54 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com expressão de caspase 3 <i>versus</i> doentes sem expressão de caspase 3 face à progressão.....	155
Figura 55 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de CD44.	157
Figura 56 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de ErbB-2.	158
Figura 57 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de CK5/6.	160
Figura 58 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de CK20.	161
Figura 59 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando o Fenótipo molecular	164
Figura 60 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com idade < 70 anos <i>versus</i> doentes com idade ≥ 70 anos face à morte específica	167

Figura 61 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do sexo masculino vs doentes do sexo feminino face à morte específica da doença	169
Figura 62 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a dimensão tumoral	170
Figura 63 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com estágio Ta <i>versus</i> T1 face à morte específica.	172
Figura 64 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com tumores de alto grau versus doente com tumor de baixo grau histológico relativamente à morte específica.....	173
Figura 65 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão do Ki-67	175
Figura 66 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes face à morte específica considerando a expressão do p53.	176
Figura 67 - Comparação entre curvas de sobrevivência à morte específica considerando a expressão de p21.....	178
Figura 68 - Comparação entre curvas de sobrevivência à morte específica considerando a expressão de p27.....	179
Figura 69 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão da ciclina D1	180
Figura 70 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão da ciclina D3.....	182
Figura 71 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à morte específica.	183
Figura 72 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de Bcl-2.	185
Figura 73 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com expressão de caspases versus doentes sem expressão de caspases face à morte específica.....	186
Figura 74 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de CD44.	187
Figura 75 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de ErbB-2.	189
Figura 76 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de CK5/6	190
Figura 77 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de CK20	192
Figura 78 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando o fenótipo molecular.....	194

Figura 79 - Comparação da expressão fenotípica molecular nos tumores de baixo grau face à recorrência, progressão e morte específica207

Figura 80 - Comparação da expressão fenotípica molecular nos tumores de alto grau face à recorrência, progressão e morte específica209

Índice de Quadros



Índice de Quadros

Quadro 1 - Grupos de Risco para o carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo.....	46
Quadro 2 - Biomarcadores incluídos no estudo do carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo.	58
Quadro 3 - Anticorpos utilizados para o estudo da expressão dos biomarcadores no carcinoma urotelial da bexiga	82
Quadro 4 - Variáveis independentes clínico-patológicas.....	87
Quadro 5 - Variáveis independentes – biomarcadores (continua).....	87
Quadro 6 - Variáveis dependentes.....	89

1. Introdução



1. Introdução

O cancro da bexiga (CB) é a segunda neoplasia urológica mais frequente após o carcinoma da próstata. A nível mundial, em 2018, a incidência estimada é de 549 000 casos e cerca de 200 000 mortes, ocupando o décimo lugar entre as neoplasias mais frequentes.⁽¹⁾

A incidência do CB aumenta, regra geral, com a idade, ocorrendo geralmente após os 60 anos, sendo raro antes dos 40. A idade média de diagnóstico situa-se entre os 65 e os 70 anos. É cerca de quatro vezes mais frequente nos homens.^(1,2)

Segundo os dados publicados pela Direção Geral da Saúde (DGS) em 2014, o CB ocupa o sétimo lugar entre as neoplasias com maior incidência em Portugal, com cerca de 2900 novos casos em 2012.⁽³⁾ A taxa de mortalidade global em 2014 foi de 9,0 (por 100.000 habitantes), representando uma taxa de 14,0 para o sexo masculino (por 100.000 habitantes) e 4,6 para o sexo feminino (por 100.000 habitantes) para o mesmo período.⁽⁴⁾ Os principais fatores de risco, nos países ocidentais, são o tabagismo e a exposição laboral a carcinogénios, sendo o tabagismo apontado como causa em cerca 50% dos casos.^(5,6)

O CB é uma doença com um impacto relevante em Saúde Pública pela sua elevada incidência e prevalência. Globalmente, assistimos a um aumento de novos casos, fruto de alterações na estrutura da pirâmide populacional e das modificações do estilo de vida ocidental.⁽¹⁾ Acresce, por outro lado, uma elevada taxa de recorrência com necessidade de terapêutica cirúrgica repetida e a permanente exigência de monitorização com instrumentação invasiva (cistoscopia) que geram uma considerável carga assistencial, potencialmente consumidora de recursos humanos e financeiros nos serviços de saúde. De facto, quando consideramos os custos associados ao tratamento das doenças oncológicas, o CB é o que apresenta o custo mais elevado por doente tratado desde o diagnóstico até ao fim da vida.⁽⁷⁻¹⁰⁾

O tipo histológico mais frequente no CB é o carcinoma urotelial (CUB) que corresponde a cerca de 90% dos casos diagnosticados. Sendo uma das neoplasias mais estudadas, a patogénese, história natural e biologia tumoral são relativamente bem conhecidas. No entanto, é uma doença heterogénea no seu comportamento, com resposta incompleta à terapêutica, com taxas de recorrência e progressão variáveis, particularmente nos tumores não músculo-invasivos.^(11,12)

A estratificação do risco de acordo com o estágio e grau histológico está bem estabelecida. Ambos são fatores preditivos de progressão, recorrência e mortalidade específica da doença. No entanto, a capacidade preditiva dos parâmetros clínicos e histopatológicos clássicos carece de precisão ao nível individual.⁽¹³⁾ A compreensão da biologia do tumor e dos mecanismos moleculares da doença, com a introdução de biomarcadores, pode adicionar informação relevante aos critérios clássicos e poderá vir a estabelecer um quadro molecular capaz de prever o comportamento individualizado do tumor.^(14,15) O conhecimento do perfil da expressão de biomarcadores, em cada tumor, poderá contribuir para a precisão diagnóstica e prognóstica nos doentes com CUB, otimizando a individualização da terapêutica oncológica.⁽¹⁶⁾

Identificar os tumores com potencial de recorrência e/ou progressão, ou tumores que poderão metastizar constitui uma necessidade e um desafio na prática clínica que poderá ser alcançada através da caracterização das alterações ao nível molecular, para discriminar a biologia das variantes tumorais subjacentes a diferentes padrões de evolução, constitui o objetivo da aplicação do estudo da expressão dos biomarcadores.

A hipótese de investigação deste estudo considera que a evolução clínica do carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (recorrência, progressão e morte específica pela doença) poderá ser prevista pelo padrão de expressão de biomarcadores moleculares nas amostras do tumor obtidas por ressecção transuretral da bexiga (RTU-V).

O projeto de investigação tem por base um estudo observacional retrospectivo de uma coorte clínica constituída por 147 doentes com o diagnóstico de carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo com um tempo de observação mediano de 76 meses. Estudamos a expressão de biomarcadores de proliferação celular, de regulação do ciclo celular, da apoptose e da diferenciação celular por métodos imunohistoquímicos no tecido de tumores uroteliais não músculo-invasivos da bexiga (Ta e T1) tendo como base a informação clínica e histopatológica dos doentes. A integração da informação obtida pelo estudo da expressão dos biomarcadores moleculares no tecido do tumor poderá permitir o desenvolvimento de ferramentas de aplicação clínica numa perspetiva da medicina personalizada.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho de investigação foi submetido e aceite para publicação na revista *Virchow Archiv* (The official Journal of the European Society of Pathology) o artigo: "PREDICTING OUTCOMES IN NONMUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER (Ta/T1): THE ROLE OF MOLECULAR GRADE BASED ON LUMINAL/BASAL PHENOTYPE" que sintetiza os principais resultados obtidos no decurso do presente projeto de investigação.

2. Revisão da literatura

2. Revisão da literatura

A revisão de literatura que se desenvolve ao longo deste capítulo procura dar conta do *estado da arte* no conhecimento que suporta conceptualmente o presente estudo e estrutura-se nos aspetos relevantes do cancro da bexiga: epidemiologia do cancro da bexiga, história natural do carcinoma urotelial da bexiga, classificação e estadiamento do carcinoma urotelial da bexiga, aspetos clínicos e biomarcadores moleculares no carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo.

Desenvolvem-se os aspetos atuais da epidemiologia do cancro da bexiga que se constitui como um problema de Saúde Pública a nível global e, particularmente em Portugal, onde se destaca a importância do CB nos próximos anos. Faz-se uma revisão do conhecimento da história natural da doença, em particular, dos aspetos da patogénese molecular e carcinogénese urotelial. Abordam-se os sistemas de classificação e estadiamento *clássicos* e a classificação molecular do carcinoma urotelial da bexiga. Revêm-se os aspetos clínicos da doença desde o diagnóstico ao tratamento e prognóstico. Finalmente, discute-se a introdução dos biomarcadores moleculares no estudo do carcinoma urotelial da bexiga na perspetiva da medicina personalizada.

2.1 - Epidemiologia do cancro da bexiga

O cancro da bexiga (CB) ocupa o décimo lugar entre as neoplasias mais frequentes a nível mundial com cerca 549 000 novos casos diagnosticados em 2018. O CB é relativamente comum em regiões mais desenvolvidas, onde ocorrem 60% de todos os casos incidentes. Ao nível global, estima-se o número de mortes por CB ocorridas em 2018 em cerca de 200 000 (em 2012 este número situava-se em 165.000), ocorrendo cerca de metade nos países mais desenvolvidos.^(1,2,17)

A incidência do CB aumenta, regra geral, com a idade, ocorrendo geralmente após os 60 anos, sendo raro antes dos 40. A idade média de diagnóstico situa-se entre os 65 e os 70 anos. A incidência do cancro da bexiga nas mulheres é cerca de um terço a um quarto da observada nos homens, mesmo depois de contabilizar os fatores de risco conhecidos, a razão para esta disparidade de género permanece inexplicada.^(1,18)

Nos Estados Unidos é o sexto tipo de cancro mais comum depois do cancro do pulmão, da próstata, mama, cólon e linfoma. Neste país, dos cerca de 70 mil novos casos

anualmente, 53.000 ocorrem em homens e 18.000 em mulheres. Das cerca de 15 mil mortes anuais, mais de 10.000 ocorrem no sexo masculino.⁽¹⁹⁾

Assim, a incidência da doença mais elevada entre os homens, leva a que o CB seja, no sexo masculino, a sexta neoplasia maligna mais comum e a nona causa de morte por cancro.⁽¹⁾

Provavelmente, fatores hormonais, anatómicos e funcionais poderão explicar esta disparidade de género relativamente à incidência. Estudos experimentais demonstram que as hormonas esteroides sexuais têm a capacidade de modificar o desenvolvimento e progressão do cancro da bexiga quimicamente induzido em modelos animais.⁽²⁰⁻²²⁾ Os estrogénios retardam ou inibem a progressão da carcinogénese da bexiga, enquanto os androgénios potenciam a carcinogénese, sustentando a hipótese de que o cancro da bexiga é um tumor hormono-dependente. Assim, é provável que o recetor de androgénio e as vias de sinalização associadas desempenhem um papel importante na patogénese do cancro de bexiga. A estimulação destes recetores correlaciona-se com a promoção do desenvolvimento e progressão do tumor, o que pode claramente explicar algumas diferenças específicas de sexo no cancro da bexiga.⁽²⁰⁻²²⁾ Embora a incidência de tumores da bexiga seja mais elevada nos indivíduos de raça branca, a da doença tem evolução mais desfavorável entre os indivíduos de raça negra com a diminuição da sobrevivência global.^(7,23)

A incidência desta neoplasia varia consideravelmente entre os países. A taxa de incidência padronizada por idade (ASR) mostra variações de aproximadamente dez vezes em todo o mundo. O sul da Europa, Europa Ocidental, América do Norte e a Ásia Ocidental registaram as taxas de incidência mais elevadas, enquanto as regiões de África apresentam as taxas mais baixas (figura 1).

Esta variações geográficas nas taxas de incidência são válidas para o sexo masculino, com o valores mais elevados a serem registados no sul da Europa (ASR = 21,8), Europa Ocidental (ASR = 19,7), América do Norte (ASR = 19,5) e Ásia Ocidental (ASR = 19,0), quanto os valores mais baixos se registam no continente Africano (ASR = 2.1-3.3) e também para o sexo feminino com uma variação similar.^(24,25)

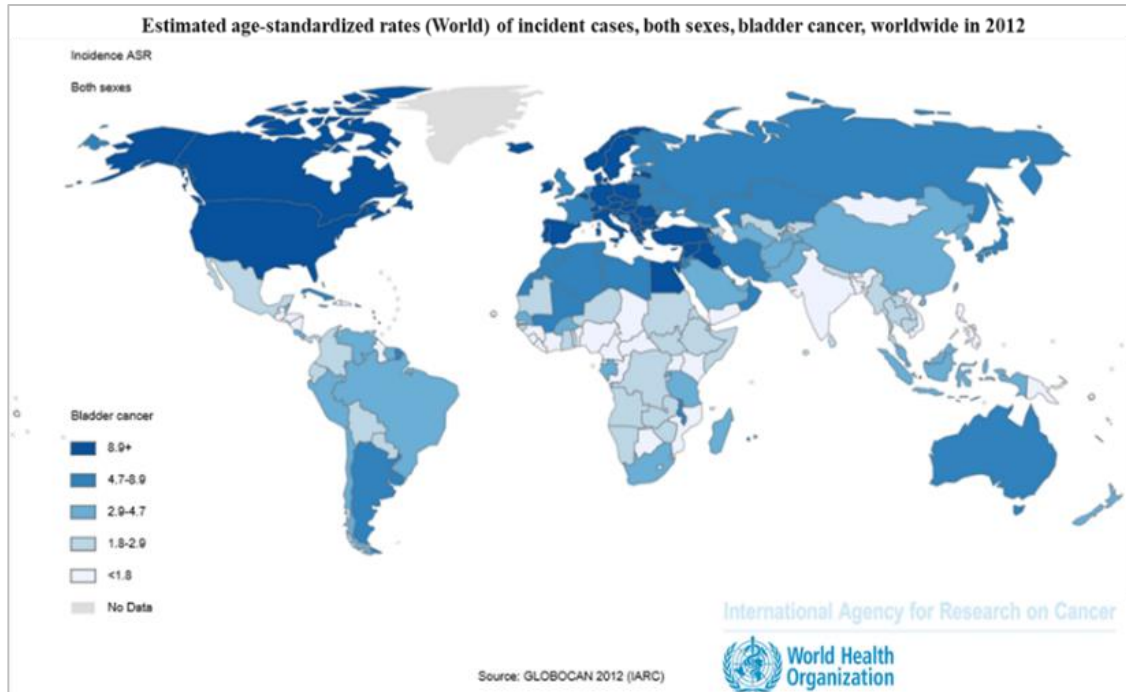


Figura 1 - Cancro da bexiga - incidência ajustada à idade no mundo.
(por 100.000 pessoas/ano, em ambos os sexos - Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer 2018: <http://gco.iarc.fr/today>).

Verificamos uma correlação positiva entre as taxas de incidência e os níveis de desenvolvimento humano. Em geral, os países mais desenvolvidos apresentam maior incidência que as regiões menos desenvolvidas em ambos os sexos. De facto, os valores de incidência da doença registados foram substancialmente maiores em países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) muito elevado (ASR = 16,7) relativamente aos países com IDH elevado (ASR = 10,8), médio (ASR = 4,7) e IDH baixo (ASR = 3,1).⁽²⁴⁻²⁶⁾

As taxas de mortalidade, considerando os dados disponíveis em 2012, variaram com uma amplitude de até sete vezes em 2012, permanecendo mais elevadas nas regiões mais desenvolvidas (ASR = 4,5 vs. 2,6 em homens; 1,1 vs. 0,7 em mulheres). Nos homens, as taxas de mortalidade mais elevadas verificaram-se na Ásia Ocidental (ASR = 8,4), Norte de África (ASR = 7,6) e Europa Central e Oriental (ASR = 6,1), enquanto as taxas de mortalidade mais baixas registaram-se na América Central (ASR = 1,2). Nas mulheres, a Europa do Norte registou a taxas de mortalidade mais elevadas (ASR = 1,5), enquanto as regiões da Ásia Central registaram as taxas de menor mortalidade (ASR = 0,5).⁽²⁶⁾

Na Europa, o cancro da bexiga, constitui a sexta neoplasia mais frequente com cerca de 120.000 novos casos diagnosticados anualmente e uma mortalidade superior a 40.000 pessoas/ano nos 28 países da União Europeia. Mesmo entre os países europeus objetivam-se diferenças na incidência e na mortalidade (figura 3). A incidência do cancro da bexiga está a aumentar em muitos países, embora a taxa de mortalidade esteja a diminuir nos países mais desenvolvidos.⁽¹⁷⁾

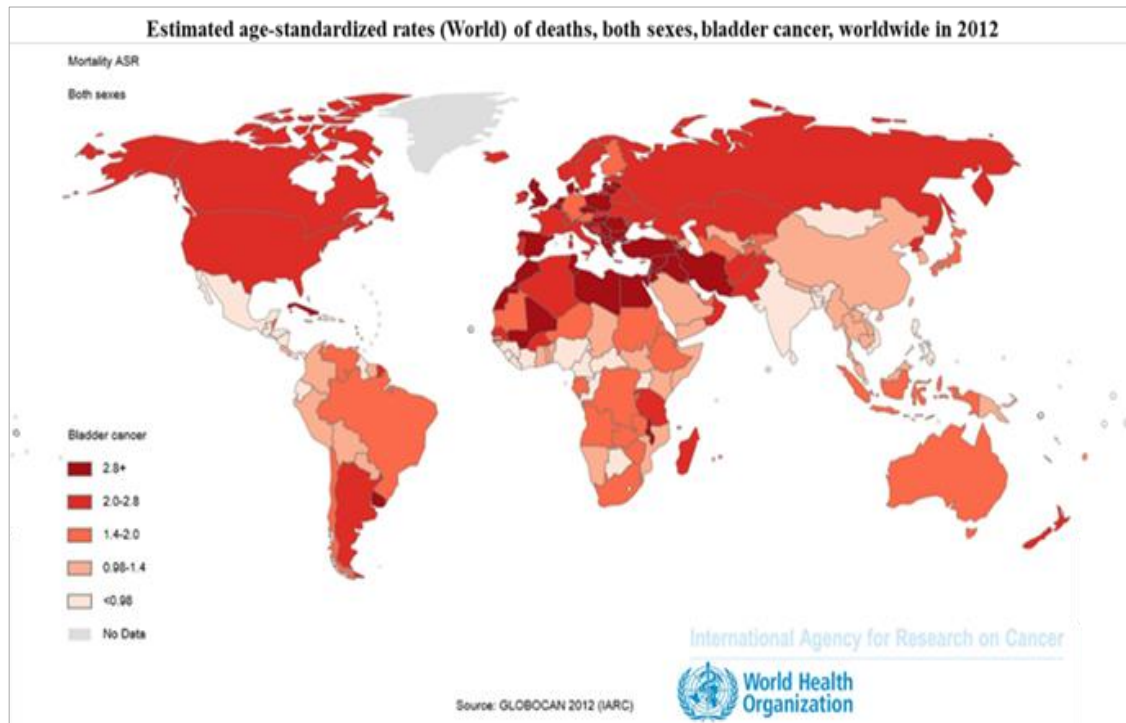


Figura 2 - Cancro da bexiga - mortalidade ajustada à idade no mundo. (por 100.000 pessoas/ano, em ambos os sexos - Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer 2018: <http://gco.iarc.fr/today>).

Com o envelhecimento da população, a incidência absoluta aumentará nos países europeus, com uma incidência de 219.000 projetada para o ano de 2030.⁽¹⁷⁾ Dados de incidência de 39 países nos últimos 10 anos relataram que um total de 7 países experimentaram aumentos nas taxas de incidência em ambos os sexos, seis deles eram países europeus.⁽²⁵⁾ No entanto, assistimos à redução da mortalidade em ambos os sexos na maioria dos países da União Europeia. A Bulgária constitui a exceção com aumento significativo tanto na incidência quanto na mortalidade no sexo masculino. Na Alemanha assinalam-se aumentos na incidência, mas diminuições na mortalidade em ambos os sexos. Nos Estados Unidos assistiu-se, nos últimos anos, a uma redução na incidência e mortalidade em ambos os sexos.⁽²⁵⁾

Num estudo recente, Antoni *et al.* examinaram os padrões globais de incidência e mortalidade no cancro da bexiga, mostrando taxas mais elevadas de incidência na

Europa do Sul e Ocidental e América do Norte, verificando taxas de incidência divergentes para os dois sexos, com estabilização ou decréscimo nos homens, mas taxas crescentes para as mulheres em muitos países.⁽²⁷⁾

Várias razões poderiam explicar a maior incidência de cancro da bexiga em países mais desenvolvidos e sua correlação positiva com o IDH. Em primeiro lugar, em países com desenvolvidos ou em rápido desenvolvimento, o aumento do IDH é acompanhada de uma maior prevalência de fatores de risco para o cancro da bexiga como o tabagismo, a obesidade, o consumo de álcool e o consumo de carne vermelha,⁽⁷⁾ fatores de risco identificados e apontados como preocupantes entre a população europeia pela OMS.⁽²⁸⁾

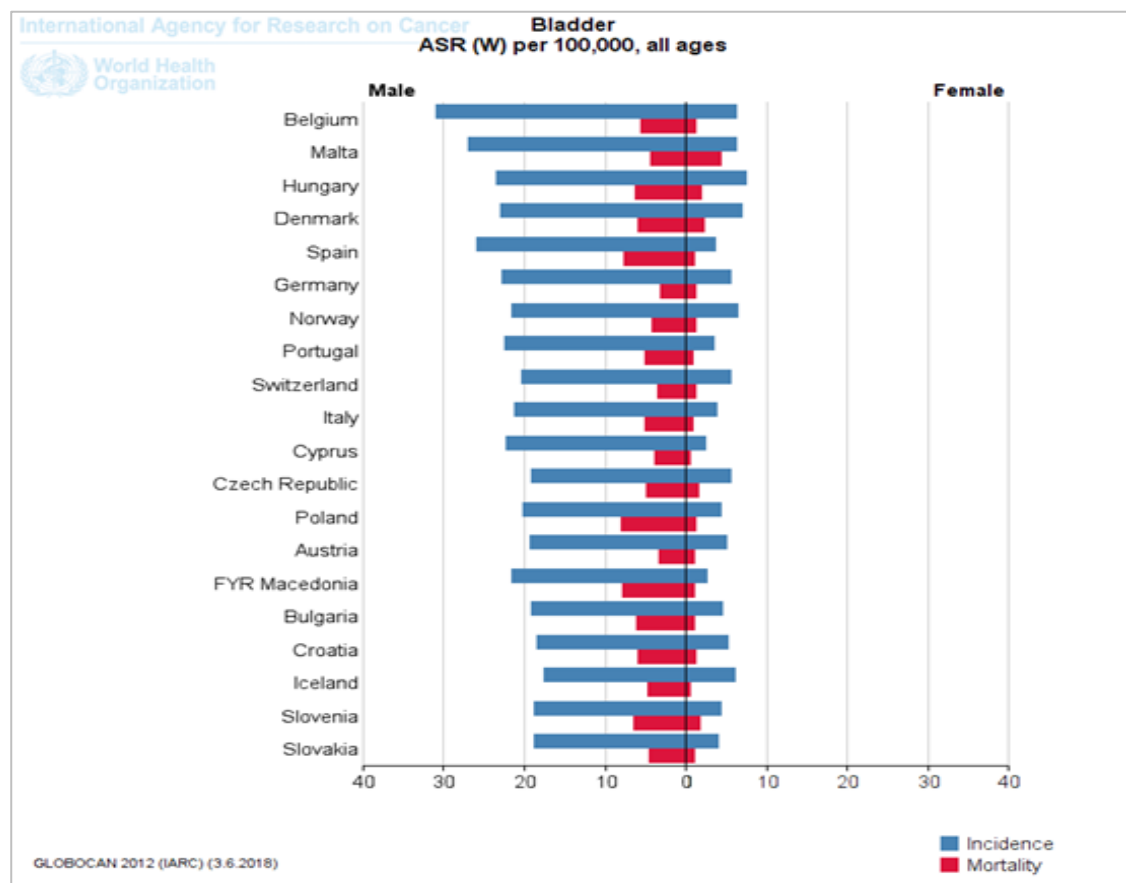


Figura 3 - Cancro da bexiga - incidência e mortalidade ajustadas à idade e sexo nos países Europeus (mortalidade por 100.000 pessoas/ano (ASR), em função do sexo, nos vinte países Europeus com valores mais elevados. - Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer 2018: <http://gco.iarc.fr/today>)

O consumo de tabaco nos países em desenvolvimento está em crescimento, superando mesmo os países desenvolvidos, onde a prevalência está a diminuir nos últimos anos.⁽²⁹⁾

Em 2012, a OMS publicou o relatório “*Mortality attributable of tobacco: WHO Global Report*“, mostrando um risco relativo de 3,0/100000 para os homens e de 2,4/100000

para as mulheres para a morte por cancro da bexiga devido ao uso de tabaco, estando este risco só majorado para o cancro de pulmão.⁽³⁰⁾

Outro fator possível para as taxas de incidência do cancro da bexiga mais elevadas que se verificam em alguns países da Europa estará relacionado com a exposição ocupacional e ambiental a agentes carcinogénios, incluindo as aminas aromáticas na indústria de corantes na União Europeia.⁽³¹⁾

O aumento de incidência do cancro da bexiga verificado nos países desenvolvidos poderá também ser *atribuído* a maior acessibilidade a serviços de saúde de qualidade e à realização de testes complementares de diagnóstico com possibilidade de diagnóstico na fase pré-sintomática. Por outro lado, algumas das variações verificadas poderão ser explicadas por diferenças nos critérios de diagnóstico ou na metodologia dos registos, o que dificulta as comparações. Os registos do cancro em países menos desenvolvidos podem sofrer uma subnotificação ou ter representatividade limitada, contribuindo para uma *menor incidência* reportada da doença.⁽³²⁾

A redução na mortalidade que se verificou na última década poderá ser uma consequência do diagnóstico mais precoce da doença, suscetível de tratamento curativo com ressecção transuretral e terapêutica adjuvante intravesical para os casos de cancro da bexiga não musculo-invasivo, bem como a estratificação da vigilância pós terapêutica com recurso à citologia urinária e à cistoscopia.^(33–35)

A elevada prevalência da doença cursa com múltiplas recorrências, apesar do tratamento adequado, produz uma sobrecarga substancial nos serviços de saúde.^(36,37)

Leal *et al.* estimaram recentemente um custo de 4,9 mil milhões de euros na União Europeia em 2012, com cerca de 2,9 mil milhões de euros de custos diretos com os cuidados de saúde. Os custos com os cuidados diretos de saúde foram calculados em 6942€ por caso prevalente, mas estes custos variam cerca de 5 vezes entre os países da EU (Letónia 2257€ e França 11937€).⁽¹⁰⁾

Em Portugal, o CB também está entre os tumores mais frequentes, ocupando o sétimo lugar entre as neoplasias com maior incidência, segundo os dados publicados pela Direção Geral da Saúde (DGS) em 2014, representando cerca de 2900 novos casos em 2012.⁽³⁾ A taxa de mortalidade global é de 9,0 (por 100.000 habitantes) para ambos os sexos, representando uma taxa de 14,0 para o sexo masculino (por 100.000 habitantes) e 4,6 para o sexo feminino (por 100.000 habitantes) no ano de 2014.⁽⁴⁾

Tumor maligno da bexiga					
	2010	2011	2012	2013	2014
Ambos os sexos					
Número de óbitos	811	888	953	922	940
Taxa de mortalidade	7,7	8,4	9,1	8,8	9,0
Sexo masculino					
Número de óbitos	604	661	717	682	690
Taxa de mortalidade	11,9	13,1	14,3	13,7	14,0
Sexo Feminino					
Número de óbitos	207	227	236	240	250
Taxa de mortalidade	3,8	4,1	4,3	4,4	4,6
Taxas: por 100 000 habitantes. Códigos da CID 10: C67					
Fonte: INE, (2016)					

Figura 4 – Mortalidade e taxa de mortalidade do Cancro da Bexiga em Portugal 2010-2014

A mortalidade por cancro da bexiga em Portugal tem vindo a crescer no período entre 2008 e 2014 (figura 4).⁽⁴⁾

As projeções para os próximos 20 anos mostram um crescimento da incidência de mais de 30% desta neoplasia em Portugal (figura 5), com um aumento de cerca de 40% na mortalidade (figura 6) no mesmo período.^(17,26)

Segundo os dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, para os homens, o risco de desenvolver esta neoplasia até aos 75 anos é de 2,59%, considerando os países do Sul da Europa e na América do Norte, enquanto para as mulheres o risco cumulativo do cancro da bexiga é de 0,37%.

O risco de mortalidade por neoplasia da bexiga é igualmente mais elevado no sexo masculino. Em Portugal este risco cumulativo é de 0,25% para os homens enquanto as mulheres têm um risco de 0,07%.⁽²⁶⁾

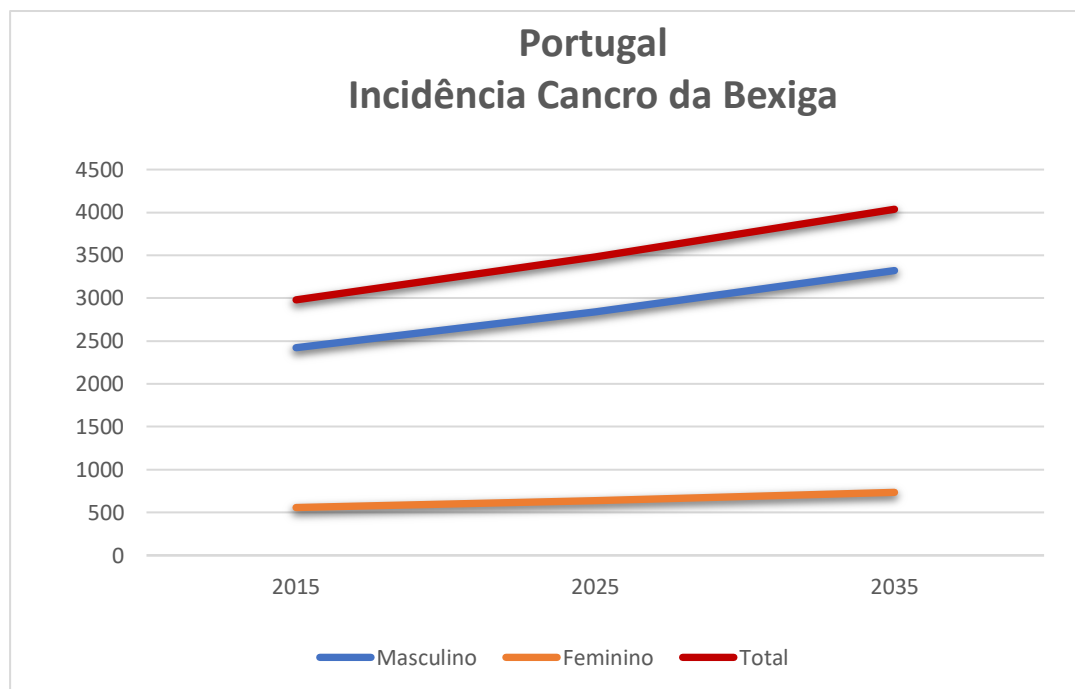


Figura 5 - Incidência do Cancro da Bexiga em Portugal em 2015 e estimativa para 2035
Projeções da GLOBOCAN para Portugal preveem um aumento da incidência do cancro da bexiga superior a 30% nos próximos 20 anos.

Com uma elevada taxa de recidivas e longa sobrevivência, o CIBNMI é uma das neoplasias mais prevalentes nos homens de meia-idade e idosos, particularmente nos países desenvolvidos,⁽⁷⁾ sendo também o tumor que apresenta maior custo de tratamento por doente durante a vida (desde o diagnóstico até à morte).⁽⁸⁾ Os custos materiais e humanos para os serviços de saúde e para os doentes devem-se à elevada taxa de recorrência e ao curso clínico prolongado que exige uma vigilância com instrumentação invasiva a longo prazo baseada na avaliação por cistoscopia.^(38,39)

Em Portugal, no ano 2012, o custo relacionado com o CB ascendeu a cerca de 71 milhões de euros, com custos diretos em cuidados de saúde superiores a 32 milhões de euros.⁽¹⁰⁾

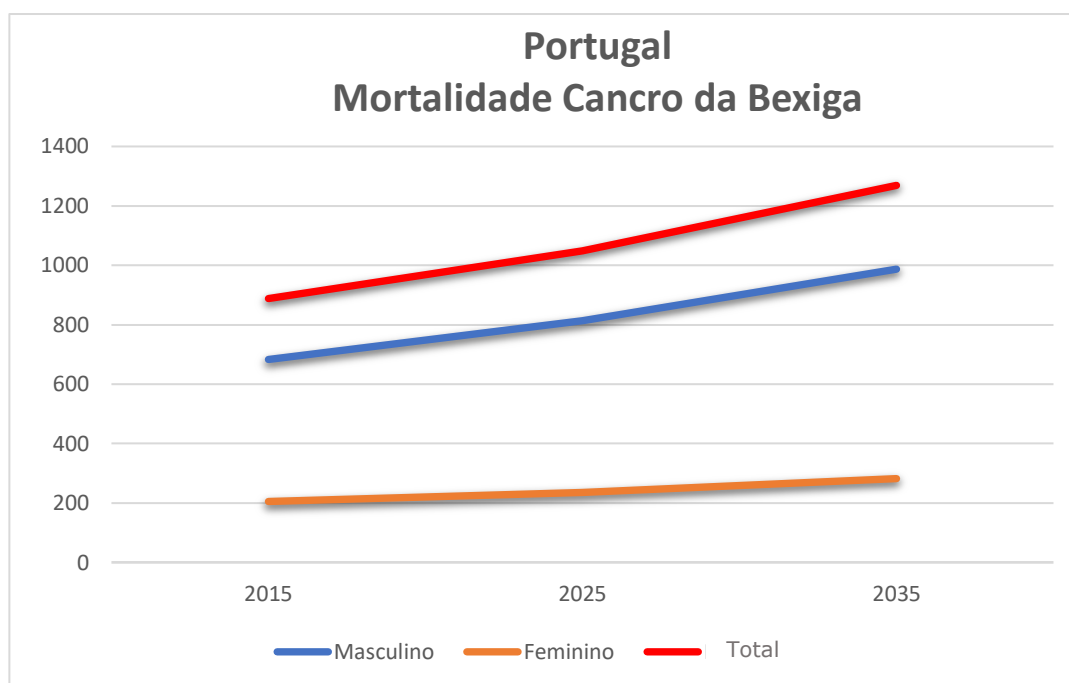


Figura 6 - Mortalidade do Cancro da Bexiga em Portugal em 2015 e estimativa para 2035
Projeções da GLOBOCAN para Portugal preveem um aumento da mortalidade por cancro da bexiga superior a 40% nos próximos 20 anos.

2.2 - Fatores de Risco

A carcinogénese da bexiga é um processo complexo multifatorial na dependência da combinação de variáveis de dois determinantes: fatores endógenos ou constitucionais (fatores genéticos) e fatores exógenos ou ambientais (geográficos, ambientais, ocupacionais e comportamentais).⁽⁴⁰⁾ O processo de carcinogénese da bexiga ou a transformação de uma célula urotelial *normal* em células malignas é causado por mutações em genes tumorais específicos associados à exposição repetitiva a carcinogénios biológicos, físicos e químicos.

O carcinoma urotelial da bexiga é uma doença oncológica com um impacto significativo em saúde pública pela sua incidência e prevalência elevadas, refletindo a elevada prevalência do tabagismo que constitui o principal fator de risco. Está igualmente estabelecida a relação causal com a exposição ocupacional e ambiental a carcinogénios químicos, muitas vezes presentes em altas concentrações e/ou por extensos períodos. O desenvolvimento da doença está relacionado com a excreção de metabolitos carcinogénios na urina.⁽⁷⁾

2.2.1 - Fatores endógenos: genética e hereditariedade

As alterações genéticas e epigenéticas relacionadas com a carcinogénese na bexiga, em interação com fatores ambientais e ocupacionais não relacionados com o consumo de tabaco, podem ser responsáveis por uma parcela significativa dos casos de cancro de bexiga em não fumadores.⁽⁷⁾ A interação entre genética e exposições pode modular o risco de cancro da bexiga, influenciar na incidência e potenciar diferenças na progressão e mortalidade do CB.⁽⁷⁾

Vários estudos epidemiológicos examinaram o papel dos fatores genéticos como fatores de risco para o desenvolvimento de CB. A maioria desses estudos identificou um pequeno aumento no risco entre os familiares de indivíduos com cancro da bexiga. O risco está majorado se o diagnóstico ocorreu antes dos 60 anos de idade.⁽⁴¹⁾ Apesar de não existir uma evidência epidemiológica forte para a influência de fatores hereditários no CB, a história familiar desta neoplasia duplica o risco e diminui a sobrevida, constituindo um *marcador* de mau prognóstico.⁽⁴²⁾

As síndromes de neoplasia familiar com alto risco de cancro da bexiga são raras e constituem menos de 1% de todos os CUB.⁽⁴³⁾ Alguns aspetos genéticos podem afetar a suscetibilidade individual aos carcinógenos extrínsecos, principalmente ao fumo do tabaco. As variantes de acetiladores *lentos* - N-acetiltransferase 2 - (NAT2) e genótipos glutatião S-transferase M1 (GST-M1) foram estabelecidos como fatores de risco para CB que, apesar de não conduzirem intrinsecamente ao cancro da bexiga, conferem um risco adicional à exposição a agentes cancerígenos como o tabaco.^(7,44,45)

A N-acetilação é a principal via metabólica no corpo humano envolvida na neutralização e desintoxicação de produtos químicos carcinogénicos. Os metabolitos acetilados são rapidamente excretados na urina antes de serem N-oxidados em formas reativas. Na espécie humana, os genes que codificam a N-acetiltransferase (NAT) são polimórficos, pelo que certas combinações alélicas resultam no fenótipo de acetilação lenta, que aumenta o risco de cancro de bexiga em indivíduos homozigotos para o gene *NAT2*, que apresentam capacidade reduzida de neutralizar e remover carcinogénios. Nos fumadores, o risco aumenta com a exposição a 4-aminobifenilas e 2-naftalamina. Da mesma forma, o risco de desenvolver CB em portadores *NAT2* com exposição ocupacional a aminas aromáticas e benzdina é maior do que o risco de trabalhadores não portadores.^(7,44,45)

O gene *GSTM-1* codifica a enzima Glutatião S-transferase-M1. Esta enzima está envolvida na desintoxicação de carcinogénios, incluindo hidrocarbonetos aromáticos

policíclicos, por conjugação com glutatião. Cerca de 50% da população caucasiana é portadora de deleção homozigótica do gene *GST M-1* (genótipo *GSTM1 null*), um polimorfismo associado à perda da atividade enzimática. Várias meta-análises propuseram que os genótipos nulos *GST-M1* estão associados a incidências elevadas de CB.⁽⁴⁶⁾ O citocromo *CYP1A2* desempenha um papel importante na ativação de numerosas vias metabólicas de aminas aromáticas, N-oxidação e N-hidroxilação. No entanto, a influência do polimorfismo da população como fator de risco do CUB não é clara.⁽⁴⁷⁾

Evidências do envolvimento de polimorfismos do gene da ciclooxygenase-2 (*COX2*) em algumas formas de carcinogénese da bexiga associadas a inflamações crónicas foram já publicadas.^(48–50) O mecanismo subjacente reside na intervenção do gene *COX2* na síntese de *prostaglandinas, que regulam e modulam respostas inflamatórias agudas e crónicas*. No entanto, *Czachorowski et al.* não encontrou evidência de que a expressão de *COX2* seja um marcador prognóstico independente de recorrência, progressão ou sobrevida em doentes com CUB numa meta-análise recentemente publicada.⁽⁵¹⁾

2.2.2 - Fatores exógenos

2.2.2.1 - Tabaco

O tabagismo aumenta o risco de cancro da bexiga 2 a 4 vezes, estando implicado como fator etiológico em cerca de 50% dos casos de cancro da bexiga nos homens e 35% nas mulheres.⁽⁵⁾

O tabagismo é o fator de risco modificável para o desenvolvimento do cancro da bexiga melhor estabelecido.⁽³⁰⁾ Além disso, há um crescente corpo de evidências de que o tabagismo afeta negativamente o prognóstico do cancro da bexiga. De acordo com a literatura atualmente disponível, o tabagismo e a exposição ao fumo cumulativos durante a vida afetam a recorrência, progressão e sobrevivência da doença, enquanto outros estudos demonstraram que a cessação do tabagismo a longo prazo reduz o risco de carcinogénese no urotélio vesical e melhora prognóstico.⁽⁵²⁾

Os produtos da pirólise do tabaco, hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas e aldeídos insaturados estão associados à génese do CUB, constituindo um fator de risco amplamente documentado para o cancro da bexiga em ambos os sexos.⁽⁵²⁾

Curiosamente, enquanto a prevalência do CB tem permanecido estável durante os últimos 30 anos, a prevalência de tabagismo tem vindo a diminuir em alguns países, nomeadamente nos Estados Unidos, durante o mesmo período.

Uma possível explicação para este facto poderá estar relacionada com alterações na composição dos cigarros verificada durante as últimas décadas, com os cigarros *light* que sofreram uma redução nas concentrações de nicotina e alcatrão, mas com um aumento na concentração de carcinogénios do grupo das nitrosaminas como a β -naftilamina, 4-aminobifenil.⁽⁵³⁾ Este aumento do risco associado ao tabaco anularia o efeito positivo da redução do seu consumo, concorrendo para que a incidência de cancro da bexiga se mantenha estável, apesar da diminuição prevalência de tabagismo.^(54,55)

Numerosos estudos demonstram que o risco aumenta com a intensidade e duração do consumo de tabaco. O período de latência entre o início da exposição e o aparecimento da doença é de cerca de 20 a 30 anos, estando estabelecida uma relação direta com a intensidade do consumo e com a duração. Fumar menos cigarros por um período prolongado parece mais prejudicial do que fumar mais cigarros por um período menor, para um total de unidade-maço-ano (UMA) consumidas. O risco diminui com a cessação do fumo, mas eventualmente nunca atinge o risco dos não fumadores.⁽⁵⁵⁾

A magnitude da influência do tabagismo como principal fator na génese do CUB é inequívoca. Em termos de saúde pública, o papel central da prevenção primária deve ser salientado com a implementação de programas de cessação tabágica, sendo previsível que as políticas de controle do consumo de tabaco poderão ter um impacto substancial na incidência e mortalidade do cancro da bexiga.⁽⁷⁾

2.2.2.2 - Exposição ocupacional

A exposição ocupacional constante e prolongada a químicos utilizados na indústria bem como as emissões de poluentes e fumos de exaustão automóvel é responsável por mais de 20% dos casos de cancro da bexiga. Constitui outro fator de risco bem estabelecido, sendo apontado como a segunda causa mais frequente de tumor da bexiga.^(7,56-58) A identificação de carcinogénicos ocupacionais potencialmente associados ao CB poderá ser difícil de determinar para exposições múltiplas a misturas complexas de compostos tóxicos. Estes mutagénicos e carcinogénicos apresentam frequentemente longos períodos de latência sob influência de polimorfismos genéticos. Ainda assim, as aminas

aromáticas, β -naftilamina, 4-aminobifenil e benzidina são substâncias inequivocamente associadas à etiologia do CUB.^(57,59)

A ligação entre as aminas aromáticas e aumento do risco de CB foi descrita pela primeira vez em 1895 por Ludwig Rehn, um médico alemão, que relatou numerosos casos de cancro da bexiga entre os trabalhadores de fábricas de corantes, relacionando-o com compostos de anilina. Em 1954, Case *et al.* documentou uma taxa de mortalidade de 10 a 50 vezes acima do esperado em trabalhadores da indústria de corantes da Inglaterra e do País de Gales, identificando como responsáveis por essa taxa de mortalidade a 2-naftilamina e benzidina. Foram ainda identificados outros compostos aromáticos como o 4-aminobifenil, 4-cloro-o-toluidina e 2-cloroanilina.⁽⁶⁰⁾ A exposição a aminas aromáticas é onipresente em muitas atividades industriais e agrícolas, assim como no fumo do cigarro. São utilizadas como antioxidantes na produção de borracha, óleos industriais e pesticidas. Podem ser encontrados em muitos ambientes profissionais, incluindo indústrias químicas, metalúrgicas, mecânicas, têxteis, petroquímicas.⁽⁶¹⁾

Numerosos estudos epidemiológicos demonstram convincentemente a relação entre exposições ocupacionais e aumento do risco de CB, e documentam uma relação direta entre a mortalidade tumoral e a exposição ocupacional a longo prazo com uma média de tempo estimada de exposição até à morte de 25 anos (com limites entre 12 e 41 anos). Nos países onde ocorreu a proibição do uso de 2-naftilamina e benzidina ocorreu uma redução do risco. A exposição pode ocorrer por via inalatória ou transdérmica com um aumento do risco em fumadores e portadores de polimorfismos genéticos vulneráveis.⁽⁶²⁾

2.2.2.3 - Exposição ao arsénio

A exposição ao arsénio presente na água potável foi reconhecida como uma causa de CB. Num estudo mais recente, o impacto a longo prazo da poluição da água por arsénio foi observada no Chile resultando numa mortalidade aumentada por CB aumentada, mesmo 20 anos após a cessação da exposição (HR: 3,6; IC95%: 3,0-4,7).^(7,63,64)

Numa meta-análise recente Tsuji *et al.* mostrou que, para não fumadores em particular, a exposição a baixas concentrações de arsénio na água potável, por si só, não contribui para um aumento na incidência do CB.⁽⁶⁵⁾

Como apontado para outras neoplasias, o risco para a ocorrência de tumor da bexiga foi relacionado com fatores nutricionais. A ingestão hídrica diária é frequentemente

apontada como um importante fator de risco, embora esta associação seja difícil de determinar.⁽⁶⁶⁾

Por um lado, a ingestão de líquidos tem um efeito direto sobre a micção, reduzindo a exposição do urotélio a eventuais carcinogénios presentes na urina quer por diluição quer pelo aumento da frequência miccional. Por outro lado, a ingestão aumentada de líquido poderá aumentar o risco se na sua composição existirem carcinogénios como o arsénio ou até desinfetantes para tornar a água potável. A cloração da água potável e o consequente aumento dos níveis de trihalometanos foram apontados como uma fonte de carcinogénios relevantes para o aumento do risco ocorrência do cancro da bexiga associado ao consumo de *água da torneira*.^(7,67,68)

Dados mais recentes de estudos prospetivos não mostram influência da ingestão total de líquidos no risco de incidência ou de recorrência do CB.^(7,66,69) A influência da ingestão do café também foi apontada como fator de risco, mas estudos recentes não mostram risco aumentado.⁽⁷⁰⁾

Para além da ingestão de líquidos, também a influência dos hábitos dietéticos foi avaliada relativamente ao risco para o CB. Foi sugerido que o consumo de carne aumentaria o risco e que o consumo de fruta de vegetais seria um fator protetor, mas estudos recentes não mostram associação com o CB.^(7,71,72)

Também a ingestão de suplementos vitamínicos ou minerais não mostrou benefício no risco.^(7,71,72)

2.2.2.4 - Radiações ionizantes e condições médicas

Patologias ou tratamentos médicos podem predispor os indivíduos ao desenvolvimento do CB como causa direta ou como efeito colateral do tratamento. A retenção urinária crónica com a consequente maior exposição do urotélio a carcinogénios, a infeção crónica por *Schistosoma haematobium* (endémico em várias regiões de África e do médio oriente) causam inflamação crónica na bexiga com posterior desenvolvimento de carcinoma espinocelular da bexiga.⁽⁷³⁾

No Egipto entre 10 e 40% dos tumores da bexiga são carcinomas de células escamosas associados à infeção crónica da bexiga pelo *Schistosoma haematobium*. A introdução de terapêutica eficaz para a schistosomíase e o aumento de prevalência do tabagismo levaram a uma redução do carcinoma de células escamosas e a um aumento da incidência do carcinoma urotelial nos últimos anos.^(7,74)

O tratamento da região pélvica por radioterapia tem sido referido como fator de risco para o desenvolvimento do CB, o tumor pode surgir cinco a dez anos após a radiação. *Abern et al.*, num estudo recente, descreveu um aumento taxa de incidência do cancro da bexiga em doentes submetidos a radioterapia para tratamento do cancro da próstata.⁽⁷⁵⁾ O mecanismo de carcinogénese está relacionado com a geração de radicais livres que causam alterações estruturais diretas no Acido Desoxirribonucleico (ADN).⁽⁷⁶⁾

A ciclofosfamida, um agente alquilante usado para o tratamento da leucemia e do linfoma, está relacionada com o aumento na incidência do cancro da bexiga, sugerida pela literatura mais antiga.^(77,78)

O risco aumentado de cancro da bexiga foi sugerido em doentes com diagnóstico de diabetes mellitus. Estudos epidemiológicos apontam para um aumento do risco de incidência de cancro da bexiga em doentes diabéticos tratados com pioglitazona, medicamento usado para o tratamento da diabetes mellitus tipo II (não-insulino-dependente) com o uso a longo prazo.^(79,80)

2.3 - Anatomia e fisiologia da bexiga

A bexiga é um órgão situado na cavidade pélvica, com a forma esférica, cuja principal função é o armazenamento de urina entre as micções. Estruturalmente, a parede vesical é constituída por várias camadas: a serosa, a muscular própria (músculo detrusor - composto por fibras musculares lisas dispostas e orientadas diferencialmente em três camadas), a *muscularis mucosae* e lâmina própria (composta de tecido conjuntivo estromal de densidades variáveis, bem como áreas descontínuas de músculo liso geralmente associadas a vasos sanguíneos) e, finalmente, o urotélio. O urotélio é um epitélio de transição de origem endodérmica. Quando visto em secção transversal, o urotélio é um epitélio multicamadas, composto por três ou mais camadas de células, dependendo do estado de distensão do órgão. Cada camada apresenta um tipo de célula morfológicamente distinto: a camada de células basais é de natureza germinativa, constituída por células com um diâmetro de 5-10 µm, na *camada* intermédia as células apresentam um diâmetro de 20 µm, na camada superficial, as células *guarda-chuva* (*“umbrella cells”*), dependendo do grau de repleção vesical, variam de 50 a 120 µm de diâmetro.⁽⁸¹⁾

As células basais e intermediárias expressam p63 e citoqueratinas de alto peso molecular (CK5, CK10, CK14).^(82,83) As células em *guarda-chuva* superficiais estão unidas entre si por junções intercelulares e são caracterizadas pela expressão de quatro proteínas uroplaquinas (Ia, Ib, II e III) e citoqueratinas de baixo peso molecular (CK18,

CK20).^(83,84) Cada célula *guarda-chuva* cobre várias células intermediárias subjacentes, que medem 20 µm de diâmetro. A superfície luminal do urotélio está coberta por uma camada de glucosaminoglicanos (GAG) que constitui uma barreira à circulação de substância entre o sangue e a urina armazenada na bexiga. Esta estrutura urotelial permite que a urina armazenada na bexiga por intervalos de tempo variáveis não sofra alterações significativas na composição.^(81,85)

2.4 - Ciclo celular e cancro

Há evidências de que o processo de transformação maligna do urotélio da bexiga é devido a alterações nas vias moleculares normalmente responsáveis pela manutenção da homeostase celular, nomeadamente alterações no ciclo celular.⁽¹⁴⁾ A compreensão da biologia do tumor e dos mecanismos moleculares da doença resultantes da introdução de biomarcadores podem adicionar informação importante aos critérios clássicos e contribuir para maior acuidade de diagnóstico, terapêutica e prognóstico.^(86,87)

Fundamentalmente, o *cancro* pode caracterizar-se como uma doença onde a proliferação celular deixa de estar sob os mecanismos fisiológicos de controle. O crescimento não controlado e a divisão das células cancerígenas interfere com o normal funcionamento do organismo, quer no local de origem, quer através da propagação para outro local, eventualmente resultando na morte. Existem características que as células neoplásicas podem apresentar, como a capacidade de induzir a vascularização do tumor (angiogénese) a fim de receber oxigénio e nutrientes ou se dispersar do local de origem para um local distante do corpo (metástase) e ainda mecanismos para suprimir a morte celular programada (apoptose).^(88–90)

O ciclo celular consiste num conjunto de passos coordenados e regulados para a proliferação celular fisiológica e fornece a chave para a compreensão da proliferação não controlada no cancro. Nas células eucarióticas, o ciclo celular, obedece a uma sequência comum de eventos: crescimento celular, replicação do ADN, distribuição do material genético (cromossomas) pelas *células filhas* e, finalmente, a divisão celular. Classicamente consideram-se, no ciclo celular, duas fases distintas a interfase e mitose. Na interfase consideram-se três subfases: G1, fase S e G2. Os complexos eventos celulares que ocorrem ao longo da mitose dividem-se ainda em subfases distintas: prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase. A fase G0 representa o estado no qual uma célula não está em divisão celular.⁽⁸⁹⁾

A duração do ciclo celular é variável consoante o tipo celular. A fase mais prolongada é a fase S, na qual ocorre *síntese* (duplicação) do material genético. As fases G1 e G2 correspondem a fases de intervalo (*gap*) entre a fase S e a fase M (Mitose).

A entrada no *ciclo celular* depende, fundamentalmente, de sinais extracelulares, conhecidos como *fatores de crescimento* que induzem a entrada da célula na fase G1 da interfase, levando à alteração do perfil de expressão génica, o que promove alterações na fisiologia e morfologia da célula que resultam no crescimento e divisão celular. Nesta fase ocorre uma intensa atividade na biossíntese de proteínas fundamentais para a replicação do ADN que ocorrerá na fase subsequente do ciclo. A passagem da fase G1 para a fase S está dependente, entre outras condições, da integridade do ADN, volume celular e da síntese proteica.

As alterações fisiológicas determinantes da entrada na fase G1 estão dependentes da expressão da proteína *ciclina D* cuja síntese é ativada pela cascata de sinalização mediada por fatores de crescimento. A família das proteínas conhecidas por ciclinas, assim designadas por sofrerem um ciclo de síntese e degradação durante as diferentes fases do ciclo celular, pode ser dividida em duas classes: as ciclinas G1/S, que inclui as ciclinas *A*, *D* e *E* e a ciclina G2/M, a ciclina *B*.⁽⁹¹⁾

Todo o processo de divisão celular é orquestrado principalmente por complexos ciclina-cinase, uma vez que as ciclinas formam dímeros funcionais com proteínas cinases específicas, conhecidas como “cinases dependentes de ciclina” (CDKs). A formação do dímero ativa as CDKs levando à fosforilação de proteínas alvo específicas, responsáveis pela progressão do ciclo celular, regulando também a replicação do DNA na fase S ou a condensação da cromatina e a formação do *fuso mitótico* na fase M. A progressão no ciclo celular para a fase S está dependente da verificação da integridade do ADN (primeiro ponto de restrição ou verificação). Esta verificação é determinante para o sucesso do ciclo celular, isto é, para que as *células filhas* apresentem as mesmas características genótípicas e fenotípicas da célula mãe, garantindo manutenção de todas atividades fisiológicas inerentes ao tipo celular original.^(89,91–93)

Quando ocorrem alterações estruturais e/ou funcionais no ADN, as proteínas responsáveis pelo sistema de reparação do ADN promovem a ativação da proteína p53 que atua como um *fator de transcrição* (proteína responsável por induzir a expressão de um determinado gene), levando ao aumento da expressão da proteína p21. Esta proteína forma um trímero com o complexo ciclina D/CDK 4 ou 6, inibindo a atividade das CDKs. Desta forma, o ciclo celular é interrompido até que o defeito no ADN possa ser reparado. Caso não seja passível de reparação, a proteína p53 irá induzir a

expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a proteína Bax que serão responsáveis pela indução da morte da célula alterada. Após a verificação da integridade do ADN, a célula progride para a fase S, onde o ADN será, finalmente, replicado. Durante a fase S, a taxa de transcrição e de síntese é reduzida, mantendo-se apenas a síntese de histonas, proteínas que serão importantes para a constituição da cromatina a partir do ADN recém sintetizado.⁽⁹¹⁾

Ao entrar na fase G2, a célula verifica a integridade do ADN recém-sintetizado (segundo ponto de restrição). Caso ocorra cópia incorreta do ADN durante S, a célula não passará o *ponto de verificação* G2/M, o ciclo celular é interrompido e são ativadas as vias da apoptose (morte programada), uma vez mais induzidas pela proteína p53. Na fase G2 inicia-se a síntese de tubulinas, proteínas fundamentais para a mitose, uma vez que contribuem estruturalmente para a formação do fuso mitótico, e a célula está apta a prosseguir o ciclo celular e entrar na fase M. Por fim, ocorre a mitose, fase M, onde ocorre a separação dos cromossomas com divisão do núcleo celular e do citoplasma e a célula dá origem a duas células. Após a divisão, as células podem entrar em fase de repouso (G0) ou evoluir no ciclo celular, entrando novamente na fase G1 (Figura 7).⁽⁹¹⁾

As células podem adquirir mutações nos genes como resultado de alterações na estrutura do ADN induzidas espontaneamente e/ou sob influência de fatores ambientais. A um primeiro nível, os genes que têm influência sobre o controle do ciclo celular e da proliferação, são agrupados em duas categorias: genes supressores de tumor (inibidor do crescimento) e proto oncogenes (promoção do crescimento).⁽⁹⁴⁾

A carcinogénese do CUB resulta da acumulação de alterações genéticas sequenciais responsáveis pela disrupção progressiva da proliferação celular normal. As células malignas em desenvolvimento adquirem um fenótipo que envolve autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, escape à apoptose, replicação ilimitada, angiogénese, capacidade de invasão e metastização.^(15,88,95)

Os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogénese podem classificar-se segundo o nível a que ocorrem as alterações em:⁽⁹⁵⁾

- Cromossómicas – numéricas ou estruturais;
- Genéticas (mutações, deleções, fragmentação, amplificações, alterações epigenéticas);
- Expressão proteica (modificações na regulação proteómica).

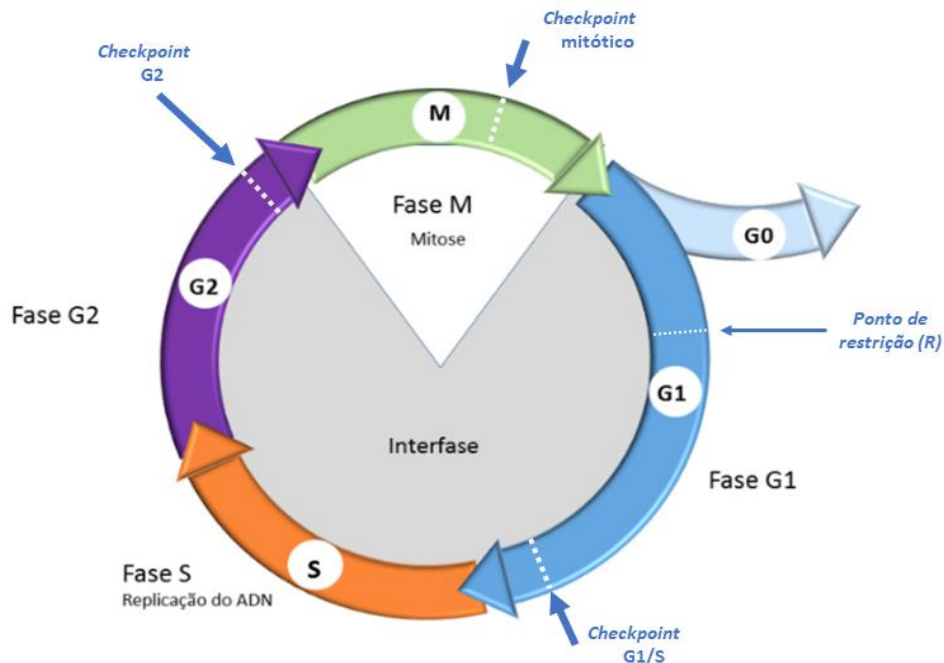


Figura 7 - Ciclo Celular.

A célula cresce durante a interfase, que consiste em três fases G1, S e G2.

A replicação do ADN ocorre na fase S. A célula divide-se em duas células-filhas na fase M (mitose).

O crescimento *autónomo* das células alteradas promove o aparecimento de uma nova estrutura - a *neoplasia*. A organização génica e cromossómica pode ser desregulada de tal forma que torna possível a existência de variantes celulares com capacidade de invadir as estruturas adjacentes e se disseminar através do sistema linfático ou dos vasos sanguíneos para outros órgãos. A carcinogénese é, assim, um processo multifaseado, com expressão tanto a nível genotípico como fenotípico. A interação de múltiplos fatores a diferentes níveis determinam diferentes genótipos e fenótipos de CUB com diferentes evoluções clínicas.⁽⁹⁶⁾

2.5 - Carcinogénese Urotelial

O carcinoma urotelial da bexiga é único entre os carcinomas. Engloba variantes fenotípicas com comportamento biológico divergente e diferente prognóstico, resultado de uma *via dupla* na carcinogénese vesical, resultando em tumores uroteliais não musculo-invasivos e tumores uroteliais musculo-invasivos (figura 9).⁽⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾

A alteração genética mais frequente é a deleção do cromossoma 9 que constitui um evento precoce no processo de carcinogénese da bexiga comum aos dois fenótipos tumorais.⁽⁹⁷⁾ De facto, anomalias no cromossoma 9 podem ser encontradas em mais de

50% de todos os CUB, independentemente do estágio e grau.⁽¹⁰¹⁾ Possivelmente as regiões suprimidas (9p-/9q-) constituem o *locus* dos genes supressores tumorais, como o gene *CDKN2A* (inibidor de cinase dependente de ciclina 2A) identificado no locus 9p21 e codifica as proteínas p16^{INK4A} e p14^{ARF}. Estas proteínas são supressoras tumorais que induzem a paragem do ciclo celular através das vias *RB* (retinoblastoma) e p53.^(102–105) É possível que outras alterações estruturais no cromossoma 9 predisponham as células uroteliais afetadas a outras alterações genéticas mais marcadas.

A análise do exoma dos tumores uroteliais da bexiga mostra um número médio de 169 a 195 mutações para os tumores papilares não invasivos^(106,107) e de 302 para os tumores musculo-invasivos.⁽¹⁰⁸⁾ Os carcinomas papilares, frequentemente, têm cariótipos diploides ou quase diploides com poucas alterações no número de cópias.⁽¹⁰⁹⁾ Em contraste, os CUBMI são aneuploides, com alterações numéricas dos cromossómicos, rearranjos,^(108,109) produzindo grandes diferenças no padrão de genes mutados.⁽¹¹⁰⁾

No CUBNMI, as duas alterações mais comuns são a deleção do cromossoma 9 e a mutação pontual no gene *FGFR3* (recetor do fator de crescimento de fibroblastos 3). Estas alterações também são encontradas na hiperplasia do urotélio,^(100,111–113) sugerindo uma relação evolutiva da hiperplasia para o carcinoma urotelial papilar.⁽¹¹⁴⁾

Os CUBNMI papilares são caracterizados pela ativação da via de regulação do ciclo celular ligada ao *RTK-Ras* (recetor tirosina cinase), exibindo mutações que ativam os oncogenes *H-RAS* (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) e *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*).^(97,115,116)

A via de sinalização do recetor da tirosina-cinase (*RTK-Ras*) desempenha um papel central na proliferação das células epiteliais pela transdução de sinais indutores da atividade mitótica entre a superfície celular e o núcleo. Mutações pontuais no *FGFR3* constituem a alteração genética mais frequente no carcinoma urotelial, podendo ocorrer em cerca de 80% dos tumores de baixo grau pTa, em comparação com 10% a 20% nos tumores invasivos. Mutações no gene *H-RAS* ocorrem em 15% dos tumores uroteliais. A sobre expressão do gene *H-RAS* está associada a tumores pTa que, provavelmente, não progridem.^(117–119)

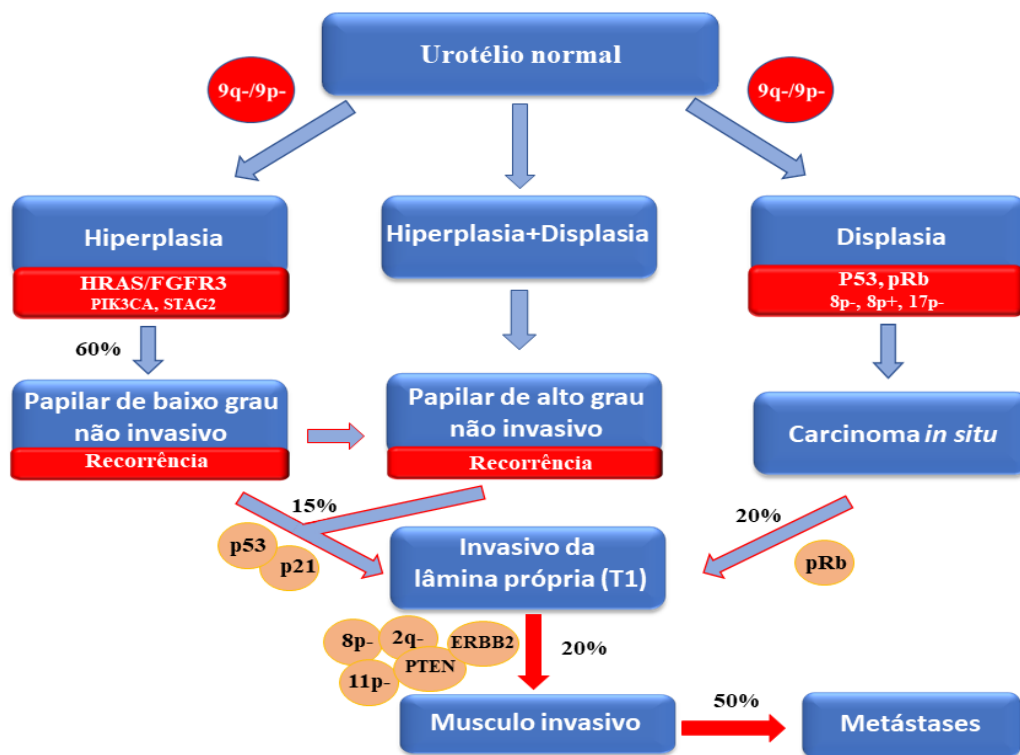


Figura 8 - Carcinogênese – Vias da carcinogênese do carcinoma urotelial

A elevada frequência das mutações nos genes *H-RAS* e *FGFR3* observada em carcinomas uroteliais de baixo grau, respectivamente em cerca de 30 e 70% dos casos, sugere que estas alterações genéticas estarão na gênese desta variante tumoral.⁽⁹⁷⁾ Ainda assim, a coexistência das duas mutações é rara, sugerindo uma provável equivalência funcional.⁽¹¹⁹⁾

Por outro lado, a maioria dos tumores invasivos de alto grau, não papilares, surgem *de novo* ou são precedidos pelo desenvolvimento de displasia urotelial de alto grau e lesões de carcinoma *in situ* (CIS) e, frequentemente, progridem e metastizam. Exibem múltiplas alterações genômicas e defeitos nas vias da proteína p53 e do retinoblastoma (RB).^(95,97) Está bem documentado o alto risco de desenvolvimento de carcinoma urotelial musculo-invasivo em lesões vesicais com displasia ou CIS⁽¹²⁰⁾ nas quais é comum a proliferação celular associada a mutações no gene *TP53*.⁽⁹⁹⁾ Além disso, é comum a expressão aumentada de CK20 e HER2 (também conhecido como ErbB-2) e a expressão diminuída de PTEN com aumento simultâneo da expressão da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K).⁽¹²¹⁾ O desenvolvimento destes tumores, em modelos animais, requer a inativação de um ou mais genes supressores tumorais, o *TP53*, *RB1* e *PTEN*.^(122–124)

Os genes supressores alterados na maioria dessas lesões^(97,115,125) estão associadas aos processos de apoptose, transdução de sinal e regulação da expressão gênica^(115,126) que se associam à recorrência e progressão tumoral em doentes tumores de alto grau e CIS.^(127–129)

O *TP53* é o gene mais frequentemente mutado no cancro humano.⁽¹³⁰⁾ A proteína p53, codificada pelo *TP53*, inibe a progressão do ciclo celular na transição G1-S e medeia o controlo da atividade transcricional de p21^{WAF1/CIP1}, que codifica o inibidor de CDK (cinase dependente de ciclina). Consistente com isso, a expressão de p21 é regulada negativamente na maioria das neoplasias uroteliais que abrigam mutações de *TP53*.⁽¹³¹⁾ O *TP53*, um gene supressor tumoral, é um elemento chave na convergência das complexas redes de sinalização celular. Alterações na sua expressão têm implicações diretas na oncogénese do CUB, nomeadamente no controlo da apoptose e, consequentemente, na proliferação celular, contribuindo para a instabilidade genómica.⁽⁹³⁾

As alterações do gene do retinoblastoma (*RB*) em carcinomas uroteliais estão frequentemente associadas ao fenótipo invasivo. Na sua forma ativa não fosforilada, a pRb inibe o fator de transcrição E2F. As CDKs fosforilam a pRb, o que causa liberação de E2F que, por sua vez, é capaz de induzir a transcrição de genes para replicação de ADN.⁽¹³²⁾ Uma pRb disfuncional leva à perda de inibição dos fatores de transcrição E2F, levando a um aumento da proliferação celular.⁽¹³³⁾

Alterações na via de Rb, isoladamente ou em combinação com a via da p53 alterada, têm alto valor prognóstico para doentes com CUB.^(134–136)

A progressão e metastização tumoral resultam de alterações genéticas adicionais, geralmente associadas a deleções dos braços curtos dos cromossomas 3, 8, 11 e 13 e dos braços longos dos cromossomas 13 e 14.⁽⁹⁹⁾

No entanto, a capacidade infiltrativa dos tumores uroteliais da bexiga através das estruturas da parede vesical, invasão dos órgãos adjacentes e metastização à distância resulta não só de fatores genéticos intrínsecos das células neoplásicas, mas também de fatores epigenéticos resultantes do microambiente tumoral. Assim, os fenótipos mais agressivos, resultam da ocorrência de múltiplas alterações morfológicas e funcionais, nomeadamente, a ocorrência de angiogénese, perda da adesão intercelular e remodelação da matriz extracelular pelas metaloproteinases da matriz (MMPs), reconhecidas como características essenciais nesse processo.^(95,97,115,125,137)

2.6 - Clonalidade e célula de origem

O carcinoma urotelial da bexiga é tipicamente uma doença multifocal o que levanta a questão da origem clonal. Se por um lado a exposição crónica de todo o urotélio a carcinogénios pode levar ao desenvolvimento de múltiplos focos neoplásicos com diferentes células de origem, por outro lado, é possível que um único clone tumoral possa estar na origem de múltiplas lesões monoclonais a partir da expansão intra epitelial ou de células libertadas durante a cirurgia.⁽¹⁰⁰⁾

Estudos recentes mostram que, embora alguns processos neoplásicos na bexiga identificados como multifocais, a maioria são monoclonais.^(100,138) No entanto, outros estudos, utilizando múltiplos marcadores moleculares ou alterações genómicas apontam a evidência clara da evolução *subclonal* dos tumores com origem numa única célula.⁽¹³⁹⁾ Numa fase inicial, regiões de urotélio “normal” são substituídas pela expansão monoclonal de células com alterações precursoras da carcinogénese nas quais é possível observar displasia ou mesmo sem alterações morfológicas. Nestas áreas do urotélio observam-se “campos” clonais de células com alterações comuns no carcinoma urotelial, nomeadamente, a perda de heterozigotia no 3q22, 5q22-23, 9q21, 10p26, 13q14 e 17q13 já presentes, permitindo a compreensão da evolução temporal dos eventos genómicos que levarão à formação do tumor.^(140,141)

Estudos experimentais apontam para a evidência que as células precursoras do CUBNMI são células da camada intermédia, isto é, não são as células basais do urotélio.^(142,143) Paralelamente, outros estudos mostram que “*stem cells*” isoladas de tumores uroteliais indiferenciados da bexiga exibem um fenótipo (CD44+, KRT14+ / KRT5+, KRT20-) semelhante às células na camada basal do urotélio normal.^(142,144) Esta diferença na origem celular para CUBNMI e CUBMI pode determinar ou restringir os eventos moleculares subsequentes no desenvolvimento do tumor.

2.7 - Classificação do Carcinoma urotelial da bexiga

2.7.1 - Classificação histológica e estadiamento

A análise histológica dos tecidos obtidos dos doentes com CUB, geralmente por ressecção transuretral do tumor da bexiga (RTU-V), permite não só determinar o tipo histológico, mas também contribuir para o estadiamento do tumor ao identificar a profundidade de envolvimento da parede da bexiga (extensão local do processo neofornativo) e o grau histológico. Estes são fatores de prognóstico amplamente

reconhecidos para a recorrência, progressão e sobrevida e constituem a base para a instituição da terapêutica.^(36,37)

O carcinoma urotelial (ou de células de transição) é o tipo histológico predominante na Europa e nos Estados Unidos onde é responsável por 90% de todos os tumores que ocorrem na bexiga. No entanto, o carcinoma urotelial frequentemente sofre uma diferenciação divergente, pelo que podem observar-se outros tipos histológicos acompanhando o carcinoma urotelial típico. As variantes mais comuns são o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma. Cerca de 5% dos casos de cancro da bexiga são carcinomas de células escamosas puros e menos de 2% são adenocarcinoma ou outras variantes.^(11,12)

O segundo tipo histológico mais frequente é o carcinoma de células escamosas, com ampla variação na incidência e prevalência em diferentes partes do mundo. Classicamente está associado à inflamação crónica e particularmente à infeção por *Schistosoma haematobium*. É mais frequente em países do norte de África onde o parasita é endémico. No Egito permaneceu a causa mais importante para o cancro da bexiga, chegando a representar mais de 70% dos casos no Egito, embora no decorrer da última década, o carcinoma de células de transição seja apontado como mais frequente.⁽⁷⁴⁾ Na Europa e nos Estados Unidos, este tipo histológico não ultrapassa os 7% de todos os casos de CB. Está geralmente associado a inflamações e infeções crónicas do aparelho urinário inferior relacionadas com a presença de litíase vesical ou algaliação crónica. A incidência está aumentada nos doentes com traumatismo medular, tratamentos com ciclofosfamida e radioterapia.^(145,146)

Em 1973, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propõe a estratificação dos carcinomas uroteliais superficiais em papiloma urotelial bem diferenciado (G1), carcinoma urotelial moderadamente diferenciado (G2) e carcinoma urotelial pouco diferenciado (G3). Em 2004 a OMS e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) introduziram uma nova classificação tendo em conta alterações citológicas e da arquitetura do tecido.⁽¹⁴⁷⁾ Esta classificação diferencia o CUBNMI em diversas categorias: neoplasia papilar urotelial de baixo grau de potencial maligno, carcinoma urotelial de baixo grau e carcinoma urotelial de alto grau. Um dos objetivos desta classificação é permitir uma maior uniformidade, diminuir as diferenças interobservador e permitir uma melhor estratificação do risco.⁽¹⁴⁸⁾ Ainda assim, a variabilidade interobservador permanece elevada, mesmo entre patologistas experientes, apesar de muitas décadas de esforços para desenvolver classificações patológicas que melhor possam refletir o comportamento clínico.⁽¹⁴⁹⁾ A evolução clínica está dependente,

naturalmente, de padrões multifatoriais de risco clínico de recorrência e progressão, determinados não apenas pelo padrão de crescimento ou o grau histológico, mas também pela dimensão do tumor, multifocalidade ou o tempo de recorrência.⁽¹⁴⁷⁾

A mais recente classificação da OMS de 2016 dos tumores do urotélio (Tabela 1) fornece uma revisão contemporânea da morfologia das neoplasias uroteliais, enfatizando a sua capacidade única de exibir diferenciação divergente, múltiplas variantes morfológicas e diversidade genômica, apontando como a morfologia e o genótipo podem ser explorados para selecionar a terapêutica de acordo com o conhecimento das vias moleculares ativadas em tumores específicos.^(12,150)

Foi introduzido o termo proliferação urotelial de potencial maligno incerto que descreve um urotélio espessado com mínima ou nenhuma atipia citológica em substituição do termo hiperplasia. Este padrão histopatológico é frequentemente observado em doentes com história de carcinoma urotelial prévio ou adjacente a lesões papilares. Podem também ser observadas “*de novo*” e, neste cenário, a relevância clínica é desconhecida. A displasia urotelial é definida como uma lesão plana com alterações citológicas e arquiteturais apreciáveis, mas que ficam, no entanto, aquém dos critérios necessários para estabelecer o diagnóstico CIS urotelial.⁽¹²⁾

Os CUBNMI podem ser divididos em duas categorias: papilar ou plano. O carcinoma desprovido de estruturas papilares é chamado de carcinoma *in situ* (CIS) e é, por definição, uma neoplasia de alto grau, exibindo, no entanto, um amplo espectro de atipias.^(150–152) As neoplasias uroteliais consideradas no nosso estudo incluem os carcinomas uroteliais não musculo-invasivos de alto grau e de baixo grau (os casos com a presença de CIS foram excluídos do estudo).

Morfologicamente, o carcinoma urotelial de baixo grau (pTa BG) é caracterizado por papilas organizadas (figura 9). Embora as variações na polaridade e tamanho nuclear, a forma e a distribuição da cromatina não sejam de importância primária, existe uma desordem citológica específica. As mitoses são raras e, se presentes, geralmente ocorrem na metade inferior do urotélio. Os desafios apresentados pelo corte tangencial de inclusão podem dificultar a análise dos aspetos arquiteturais, que podem ser confundidos com o urotélio irregular. Se diferentes graus forem detetados na mesma lesão, o tumor deve ser classificado de acordo com o maior grau observado.⁽¹⁵⁰⁾

Tabela 1 - Classificação da OMS do tumor urotelial⁽¹⁵⁰⁾

Tumores uroteliais não invasivos
Carcinoma urotelial in situ
Carcinoma urotelial papilar, baixo grau
Carcinoma urotelial papilar, alto grau
Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno
Papiloma urotelial invertido
Proliferação urotelial de potencial maligno incerto (hiperplasia)
Displasia urotelial

Tumores uroteliais invasivos
Carcinoma urotelial infiltrativo com diferenciação divergente
“Nested”
Microquístico
Micropapilar
Linfoepitelioma-like
Plasmocitoide / célula em anel de sinete / difuso
Sarcomatoide
Células gigantes
Indiferenciado
Rico em lipídios
Células claras
Tumores tipo mülleriano
Tumores em divertículo vesical

As lesões de alto grau (AG) são caracterizadas por uma aparência completamente desordenada em baixa ampliação devido à desorganização citológica, nuclear e arquitetônica. O espectro do pleomorfismo é amplo e varia de moderado a acentuado, mas é consensual não subdividir esta categoria de lesões em dois subgrupos.

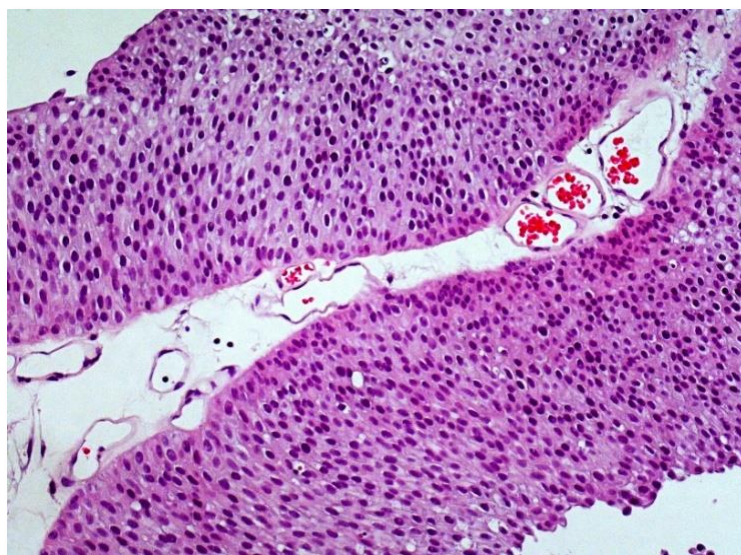


Figura 9 - Carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau

No entanto, o grau de atipia nuclear é importante: os núcleos têm nucléolos proeminentes e são pleomórficos, exibindo mitoses frequentes. A necrose intraepitelial pode estar presente. A espessura do urotélio pode variar consideravelmente com papilas fundidas a exibem um crescimento anárquico (figura 10).^(12,148)

Os tumores de AG devem ser considerados lesões agressivas. Os tumores de AG podem ser pTa, mas também pT1-4. Os carcinomas uroteliais pT2-4 são geralmente classificados como tumores de AG de acordo com a OMS 2004/2016.^(12,150,153)

Na apresentação clínica inicial, 70 a 80% dos carcinomas uroteliais da bexiga são diagnosticados como tumores não musculo-invasivos (estádios Ta e T1).

Uma das características clínicas destas neoplasias é a recorrência frequente, aproximadamente entre 50 e 70% dos CUBNMI recorrem e aproximadamente 10 a 20% dos casos progridem para doença músculo-invasiva, particularmente nos tumores de alto grau.^(154,155)

Entre 20 a 30 % dos carcinomas uroteliais da bexiga são diagnosticados como neoplasia músculo-invasivas com um elevado risco de progressão e metastização, com uma sobrevivência global aos 5 anos próxima dos 50%, apesar da abordagem terapêutica multimodal com tratamento cirúrgico (cistectomia radical e linfadenectomia pélvica) e terapêuticas citotóxicas adjuvante e neoadjuvantes.⁽¹⁵⁴⁾

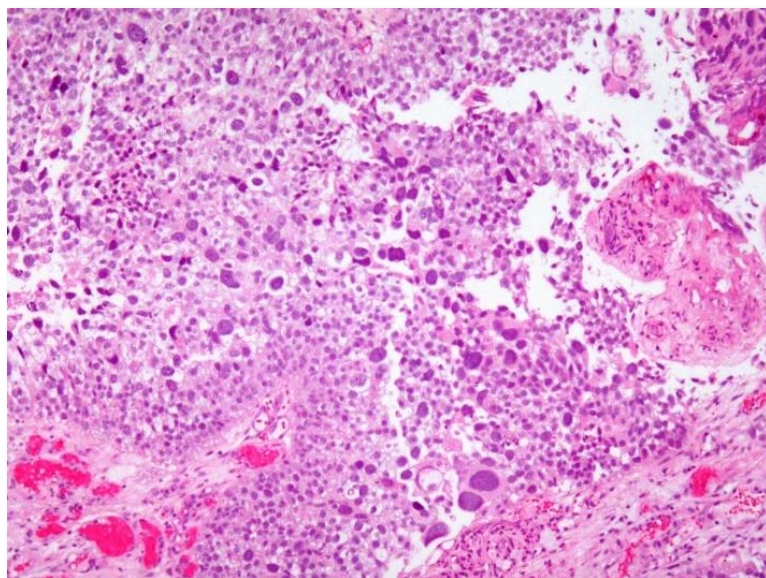


Figura 10 - Carcinoma urotelial de bexiga de alto grau

O sistema de estadiamento amplamente usado na prática clínica para o carcinoma urotelial da bexiga é a classificação da AJCC/TNM (American Join Committee of Cancer: *Tumor, Node, Metastasis*), revisão de 2016, que se sumariza na tabela 2.⁽¹⁵⁶⁾

Trata-se de um sistema de classificação baseado em dados clínicos e imagiológicos (com confirmação citológica ou histológica da doença) que permite estabelecer a extensão do processo neofomativo. Neste sistema de estadiamento, as categorias do estágio T do tumor primário na bexiga são definidas pela extensão da invasão do tumor através sua parede vesical.⁽¹⁵⁶⁾

O estágio patológico (pT) é um determinante crítico no prognóstico do CUB.^(36,37,157) Os tumores não musculo invasivos incluem o tumor papilar (pTa) e o tumor plano (CIS / carcinoma *in situ*) que estão confinadas ao urotélio e também as lesões com invasão do tecido subepitelial (infiltração da lâmina própria pT1).

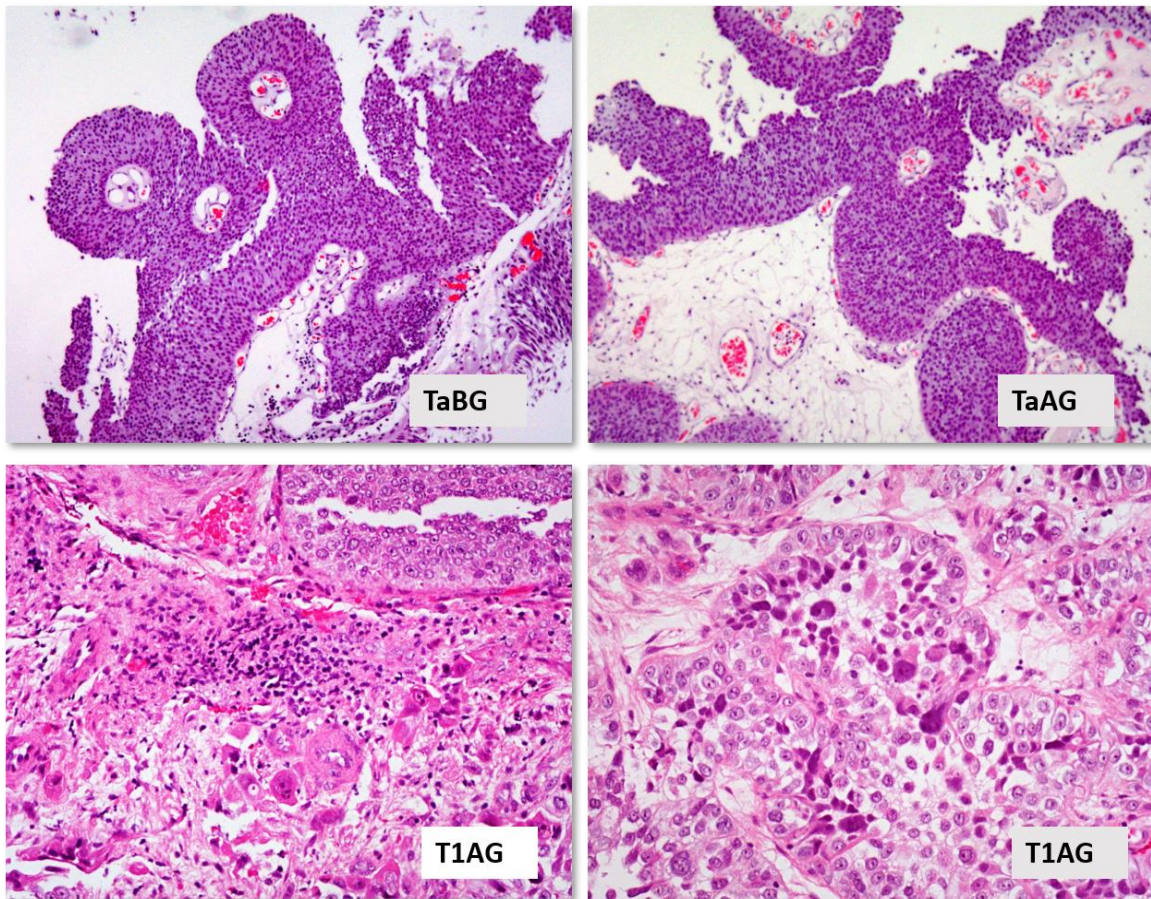


Figura 11- Carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1)

De acordo com o sistema de classificação da OMS de 2016, os tumores pTa e pT1 são classificados em BG e AG e todos os carcinomas uroteliais invasivos do músculo detrusor são considerados tumores de AG.^(12,150)

Os tumores pTa não invadem a lâmina própria (pelo que não apresentam invasão linfovascular com muito baixo risco de metastização à distância). Já os tumores pT1 invadem o tecido conjuntivo subepitelial que compreende a lâmina própria e a *muscularis mucosae* com possibilidade de invasão linfovascular e metastização à distância. Em muitos casos, os patologistas irão identificar os tumores pT1 como tumores de HG, independentemente da sua atipia.⁽¹⁵⁰⁾

Tabela 2 - Classificação do Tumor Vesical TNM⁽¹⁵⁶⁾

T- Tumor primário

TX	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> ("tumor plano")
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor que invade o músculo T2a Tumor que invade a camada muscular superficial (metade interna) T2b Tumor que invade a camada muscular profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido perivesical T3a microscopicamente T3b macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal T4a Tumor que invade a próstata, útero ou vagina T4b Tumor que invade a parede pélvica ou parede abdominal

N- Gânglios Linfáticos Regionais

NX	Gânglios linfáticos regionais não avaliáveis
N0	Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases num único gânglio linfático pélvico (perivesical, hipogástrico, obturador, ilíaco externo ou pré-sagrado)
N2	Metástases em múltiplos gânglio linfático pélvico (perivesical, hipogástrico, obturador, ilíaco externo ou pré-sagrado)
N3	Metástases em gânglios linfáticos na íliaca primitiva

M- Metástases à Distância

M0	Sem metástases à distância
M1a	Metástases em gânglios não regionais
M1b	Outras metástases à distância (não ganglionares)

O sufixo (m) deve ser adicionado à categoria T para indicar múltiplos tumores

Quando o tumor invade a *muscularis própria* pode ser estratificado pela profundidade de invasão da parede muscular (T2a, T2b). Se ultrapassa o limite do órgão e se estende ao tecido conjuntivo perivesical é classificado como T3 (T3a, T3b). O tumor T4 invade estruturas adjacentes à bexiga.⁽¹⁵⁶⁾

O carcinoma *in situ* (CIS ou Tis) é um tumor urotelial plano, de alto grau, não invasivo, geralmente multifocal que pode ocorrer na bexiga ou menos frequentemente no trato urinário superior ou mesmo na uretra. ^(158,159) O diagnóstico de CIS por cistoscopia pode ser difícil na ausência de biópsia, pois assemelha-se a uma lesão inflamatória.

O CIS está presente em cerca de 25% dos tumores uroteliais de alto grau, exibindo, à observação microscópica, uma desordem estrutural e anaplasia nuclear semelhantes ao tumor de alto grau. ^(158,159)

O carcinoma urotelial da bexiga pode invadir progressivamente as estruturas que constituem a parede vesical: o urotélio, a membrana basal da lâmina própria, a *muscularis mucosae* (constituída por fibras musculares lisas e por um plexo vascular), a camada muscular própria, a serosa e a gordura perivesical (figura 12).

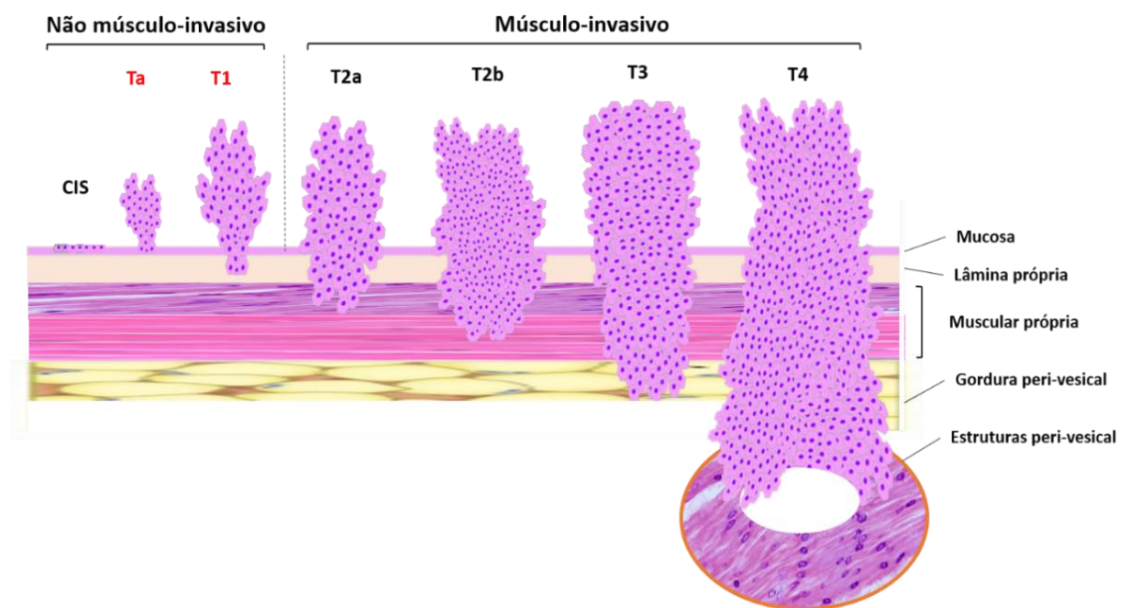


Figura 12 - Classificação TNM do Carcinoma Urotelial da Bexiga -T
Representação esquemática do Carcinoma Urotelial da Bexiga – invasão das estruturas da parede vesical.

A classificação (estadiamento) TNM e o grau histopatológico são parâmetros amplamente utilizados na estratificação do risco de recorrência e particularmente no risco de progressão do CUBNMI. ^(118,160–162)

A importância da histopatologia no diagnóstico, prognóstico e tratamento do carcinoma urotelial da bexiga é inequívoca. No entanto, a variabilidade interobservador é uma limitação técnica frequentemente apontada. ^(36,37,163,164)

2.7.2 - Classificação molecular do carcinoma urotelial

Embora classicamente o carcinoma urotelial da bexiga seja classificado como CUBNMI e CUBMI, análises moleculares recentes levaram a novas propostas de classificação baseadas em alterações genómicas.^(36,165–171) Estas classificações moleculares distinguem os tumores uroteliais em dois subtipos moleculares referidos como luminal e basal com comportamento clínico distinto e diferentes sensibilidades à quimioterapia e imunoterapia.^(100,169,171–178) A identificação dos subtipos moleculares baseia-se na análise de transcrição do genoma com a identificação de cinco categorias de tumores uroteliais. Estes subtipos exibem uma expressão diferencial de citoqueratinas, *status* de mutação *FGFR3*, perfis genéticos de adesão celular e diferentes perfis de expressão de genes do regulador de ciclo celular.^(100,169,171–178) As 5 categorias incluem urobasal A, urobasal B, genomicamente instável, carcinoma de células *escamosas-like*, e infiltrativo. Os três principais subtipos, urobasal, genomicamente instável e carcinoma de células escamosas podem distinguir-se com base na morfologia e perfil imunohistoquímico, permitindo a identificação no exame anatomopatológico *standard*.^(100,169,171–178) *Patschan et al.* mostrou diferenças estatisticamente significativas no prognóstico quando aplicada a estratificação para subtipo molecular em doentes com pT1.⁽¹⁷⁹⁾

Os dados disponíveis sugerem que os subtipos moleculares de CUBNMI poderão representar um novo paradigma de classificação com potencial para poder ser introduzida no algoritmo de decisão clínica, uma vez que estas categorias moleculares melhoram a precisão dos grupos prognósticos e têm o potencial de melhor definir a probabilidade de resposta às terapêuticas atuais. No entanto, a taxonomia molecular do CUB é baseada na análise molecular por metodologias genómicas complexas com necessidade de tecnologia dispendiosa não amplamente aplicável aos diagnósticos clínicos.^(100,169,171–178)

Numa lógica de aplicação à clínica, *Choi et al.*⁽¹⁷⁸⁾ sugeriu recentemente a utilização de marcadores imunohistoquímicos com potencialidade de identificação dos subtipos moleculares. Inicialmente, um número significativo de marcadores imunohistoquímicos foram identificados para suportar a classificação de luminal/basal no CUB. A utilização de marcadores moleculares baseado em duas citoqueratinas (CK20 e CK5/6) foi apontado com valor potencial na identificação fenotípica dos genótipos luminal/basal no cancro da bexiga.^(178,180) Esta abordagem foi recentemente validada numa coorte de doentes com carcinoma urotelial superior, em que esta *assinatura* de dois marcadores foi capaz de identificar os doentes com pior sobrevivência específica.⁽¹⁷⁴⁾ Estes resultados parecem identificar marcadores imunohistoquímicos que permitiriam uma

classificação simples e económica do CIBNMI. No entanto, até agora, apenas dispomos dum número limitado de estudos envolvendo a aplicação da taxonomia molecular no CUBNMI. Os estudos mais robustos evidenciando o valor preditivo da taxonomia molecular no prognóstico e na resposta à terapêutica surgiram no CUBMI, o que leva à necessidade de mais informações relacionadas com o CUBNMI.^(174,177,181)

2.8 - Aspetos clínicos

A hematúria macroscópica indolor é o sinal mais frequente associado ao CIBNMI (tumores Ta e T1), ocorrendo em cerca de 85% dos casos.⁽³⁶⁾ A prevalência de CUB varia entre 13 e 35% em doentes com hematúria macroscópica e entre 5 e 10% em pacientes com hematúria microscópica.^(182,183) Embora os tumores Ta e T1 raramente causem outros sintomas, o CIS pode causar sintomas irritativos vesicais, levando este quadro clínico a considerar a sua existência, particularmente, na ausência de resposta à terapêutica convencional.^(36,37)

Nos casos de doença avançada pode surgir obstrução ureteral com dor lombar ou dor abdominal, retenção urinária ou, mais raramente, sintomas relacionados com a extensão da doença a outros órgãos ou metástases à distância. As formas não invasivas do tumor vesical raramente revelam alterações do exame objetivo.^(36,37)

Dos estudos imagiológicos, a ecografia do aparelho urinário permite objetivar a existência de lesões vesicais, particularmente as lesões papilares. No entanto, o CIS não pode ser detetado por ecografia (ou por outro método de imagem).⁽¹⁸⁾ A cistoscopia (observação endoscópica direta da bexiga) constitui o exame complementar de eleição para o diagnóstico dos tumores da bexiga com sensibilidade variável e dependente do operador.^(18,36)

Após o diagnóstico inicial de cancro da bexiga, o procedimento padrão, no caso do carcinoma urotelial não musculo-invasivo, é a ressecção transuretral da lesão (RTU-V). No entanto, pequenos tumores, particularmente lesões planas como o CIS podem não se detetar ou serem incompletamente ressecadas levando a taxas de recorrências elevadas e mesmo abrindo a possibilidade de se tornarem lesões musculo-invasivas.^(36,37)

Para aumentar a sensibilidade na deteção de tumor vesical desenvolveram-se novos métodos que aumentam o *contraste* entre o *urotélíio normal* e o tecido hipervascular do tumor como o *narrow-banding imaging* (NBI).^{184,185} Estas tecnologias melhoram a diferenciação de lesões tumorais do tecido normal, aproveitando o aumento da atividade

metabólica (luz azul) e da arquitetura dos vasos (NBI) que ocorre nas células tumorais e apresenta maior especificidade para o cancro de bexiga do que a cistoscopia tradicional.^(184,185) Está demonstrado também um aumento na taxa de detecção de tumor vesical quando se fazem cistoscopias, biópsias e RTU-V guiadas por NBI.^(37,186,187) Também a detecção (e diagnóstico) do CIS pode ser aumentada com a realização de cistoscopia de fluorescência ou NBI.^(184,185)

Embora a cistoscopia esteja indicada em todos os doentes em que existe uma suspeita diagnóstica de tumor da bexiga, a sua realização poderá ocorrer imediatamente antes da ressecção endoscópica se exames imagiológicos são inequívocos no diagnóstico do tumor vesical.

A citologia urinária é um método diagnóstico não invasivo que apresenta uma sensibilidade global de 48%, com uma especificidade de 86% (o valor preditivo positivo é de 90%, enquanto o valor preditivo negativo é de 34%) para a detecção do CUB. Para as lesões de alto grau, a sensibilidade aumenta para 84%. Nos carcinomas uroteliais de baixo grau, a sensibilidade da citologia urinária não ultrapassa os 16%.⁽¹⁸⁸⁾ No CIS (lesões planas superficiais mas com elevado potencial de progressão), a citologia urinária tem uma sensibilidade e especificidade de 28% e 100% respetivamente, tornando-se particularmente útil quando associada à cistoscopia.^(37,189)

No estadiamento do CUBMI, isto é, para avaliar a extensão local do processo neofornativo e a metastização à distância, a tomografia axial (TAC), a ressonância magnética (RM), a cintigrafia óssea (CO) e o PET (tomografia por emissão de positrões) constituem exames complementares de diagnóstico com indicação bem estabelecida.^(18,36,37,190)

2.9 - Tratamento

O tratamento do CUBNMI é cirúrgico através de ressecção transuretral do tumor da bexiga (RTU-V), habitualmente sob anestesia geral ou bloqueio sub-aracnoideu (anestesia raquidiana). Este procedimento permite a visualização direta da bexiga com remoção completa da lesão, incluindo a camada muscular para um estadiamento preciso. É uma cirurgia bem tolerada, com morbilidade mínima, permite remover a neoplasia com preservação anatómica e funcional do órgão.^(37,100)

A RTU-V inicial é o procedimento chave na patologia neoplásica da bexiga, constituindo ainda a terapêutica adequada para muitos doentes com tumores não músculo-invasivos, mas não menos importante, permitindo o conhecimento da verdadeira extensão da doença pela obtenção de material para estudo anátomo-patológico. No entanto, até 60%

dos doentes irão apresentar recidiva do tumor após a RTU-V. A recorrência depende de fatores como a ressecção incompleta, implantação de células tumorais, crescimento de tumores microscópicos e formação de novos tumores.⁽¹⁹¹⁾

Nos doentes com doença de alto risco, a RTU-V inicial pode não mostrar doença musculo-invasiva, estando presente, em cerca de 20% dos casos, mesmo com inclusão da muscular própria no tecido ressecado. Se a muscular própria não estiver representada na ressecção, esta percentagem pode atingir os 40%.^(36,190,192) A presença de CIS significa a existência de doença clinicamente agressiva que, sem o tratamento adequado, progride para doença musculo-invasiva em 54% dos casos.^(120,193)

Fatores como a dimensão do tumor, a multiplicidade e até a localização do tumor na parede vesical concorrem para que a possibilidade de ressecção incompleta possa ocorrer em até 50% dos casos após diagnóstico cistoscópico. Uma vez que a terapêutica adjuvante do carcinoma urotelial é maioritariamente determinada pela informação histopatológica resultante da qualidade da RTU-V, é fundamental que o estadiamento obtido coincida com o estágio do tumor. A repetição da RTU-V no período de 2 a 6 semanas em doentes em que o tumor foi incompletamente ressecado, em tumores com invasão da lâmina própria (T1) e na doença de alto grau aumenta a precisão diagnóstica e diminuiu a recorrência tumoral.^(37,194,195) *Divrik et al.* demonstrou, num estudo prospetivo randomizado, que a repetição da RTU-V após o diagnóstico de carcinoma urotelial pT1 poderá diminuir em 25% a recorrência e a aumentar a sobrevida livre de progressão em 14% aos 5 anos.⁽¹⁹⁶⁾

Como vimos, alguns tumores vesicais podem recorrer e progredir. A recorrência precoce (< 3 meses) está habitualmente associada a ressecção incompleta da lesão.⁽¹⁹⁷⁾

A quimioterapia intravesical em dose única após a RTU-V com mitomicina C, doxorrubicina ou epirubicina está indicada nas primeiras 24 horas após a cirurgia e pode diminuir a recorrência da doença em 40% no primeiro ano após RTU-V e também a longo prazo (até 15% aos 5 anos).^(198,199) Nos doentes com tumores papilares clinicamente não sugestivos de invasão da muscular própria da bexiga, a instilação vesical de quimioterapia deve ser imediata se não houver evidência de perfuração da bexiga ou hematúria macroscópica. A quimioterapia local atua destruindo as células em suspensão na bexiga após a RTU-V e também pelo efeito químico-ablativo sobre o tumor residual.⁽²⁰⁰⁾ O benefício oncológico da terapêutica adjuvante intravesical no pós-operatório imediato é particularmente útil nos doentes com tumores de baixo risco, constituindo, muitas vezes, o único tratamento adjuvante necessário. Nos doentes com risco intermédio e alto risco está indicada terapêutica adjuvante com instilação

intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) cujo benefício na diminuição da recorrência e progressão é superior à quimioterapia intravesical.^(201,202)

A manutenção da terapêutica adjuvante com BCG intravesical deve ser prolongada até um ano nos doentes com risco intermédio e até 3 anos nos doentes com doença de alto risco com o potencial de diminuição da progressão em 37% quando comparada com a não manutenção do BCG.^(202–204) Quando se verifica a progressão da doença sob terapêutica adjuvante com BCG, ou ocorre intolerância ao tratamento, a cistectomia radical está indicada, embora possam considerar-se protocolos terapêuticos com conservação do órgão.⁽²⁰⁵⁾

O prognóstico dos carcinomas uroteliais musculo-invasivos é francamente pior do que o observado no grupo dos tumores não musculo-invasivos. O tratamento *standard* para a doença musculo-invasiva (T2-T4) não metastizada é a cistectomia radical com linfadenectomia íleo-pélvica. Embora a cistectomia radical seja tradicionalmente realizada com uma técnica cirúrgica aberta, a cirurgia robótica minimamente invasiva utilizando o sistema *Da Vinci®* (*Intuitive Surgical, Sunnyvale, California, USA*) tem potenciais benefícios na redução da perda de sangue, na dor pós-operatória e nos resultados funcionais, mantendo equivalência nos resultados oncológicos.⁽²⁰⁶⁾

A linfadenectomia pélvica é um procedimento determinante no tratamento cirúrgico do CUBMI com resultados demonstrados na sobrevivência global, embora não esteja claramente estabelecida a extensão da linfadenectomia.⁽²⁰⁷⁾

Os resultados da sobrevida após a cistectomia radical estão dependentes do estadiamento patológico final (na peça operatória). A sobrevida livre de doença quando não se documenta envolvimento ganglionar (pN0) é de 86% para tumores pT0, 76% para pT1-T3a, 61% para pT3b e 45% para pT4. Com envolvimento ganglionar, a sobrevida livre de doença aos 10 anos cai para 34% independentemente do T.⁽²⁰⁸⁾ Apesar dos resultados oncológicos alcançados com o tratamento cirúrgico do carcinoma urotelial musculo-invasivo confinado ao órgão, com margens cirúrgicas negativas e gânglios linfáticos sem neoplasia, muitos doentes experimentam recorrência e progressão da doença, levando a considerar as terapêuticas multimodais.⁽²⁰⁸⁾

O papel da quimioterapia neoadjuvante, evidenciado em diversos ensaios clínicos e metaanálises, mostra uma vantagem na sobrevida.⁽²⁰⁹⁾ Assim, em doentes com CUBMI, particularmente com doença < cT3, a quimioterapia neoadjuvante (à base de cisplatina) deve ser considerada, caso o estado geral do doente permita. Se o estado do doente impossibilitar a quimioterapia ou não for tolerada, poderá estar indicada a cistectomia radical imediata.⁽¹⁰⁰⁾

2.10 - Recorrência e progressão

Aproximadamente 75% dos CUB diagnosticados são não músculo-invasivos e geralmente têm bom prognóstico. Entre 30 e 80% recorrem com CUB não músculo-invasivos após o tratamento. A progressão da doença ocorre entre 1% a 45% dos casos para doença músculo-invasiva e metade destes desenvolverá metástases. O tratamento cirúrgico precoce, a terapêutica adjuvante com quimioterapia com mitomicina C e/ou de imunoterapia intravesical com BCG, traduz-se em taxas de sobrevivência aos 5 anos de cerca de 90%.^(37,210,211)

A recorrência (sinónimo de *recidiva*) tumoral define-se, no nosso estudo, como o diagnóstico de um *novo* tumor vesical, confirmado por análise anatomopatológica, não diferindo em “T” ou grau histológico do tumor anteriormente tratado, num doente com um período mínimo de três meses livre de doença, controlado por cistoscopia e citologia.

A progressão da doença, no nosso estudo, ocorre perante a existência de uma recorrência tumoral na bexiga cuja análise anatopatológica revele a presença de infiltração da muscular própria ou o aumento do grau histológico do tumor. Também se considera progressão se são diagnosticadas adenopatias “*de novo*” (extensão ganglionar da doença) ou a presença de metástases noutros órgãos, com confirmação histológica de tumor urotelial.

Na prática clínica a estratificação do risco para a recorrência e progressão do CUB baseia-se em critérios clínicos e histopatológicos de análise das peças operatórias obtidas por ressecção transuretral das lesões neoplásicas da bexiga (RTU-V).⁽²¹²⁾ Com o objetivo de estimar a probabilidade individualizada da recorrência e progressão da doença ao 1 ano e aos 5 anos e definir estratégias terapêuticas e protocolos de seguimento dos doentes a curto e longo prazo, o “*Genito-Urinary Cancer Group*” da “*European Organization for Research and Treatment of Cancer*” (EORTC) desenvolveu um calculador de risco baseado num “*score*” obtido pela aplicação de parâmetros clínicos histopatológicos CUB não músculo-invasivo (Ta,T1).⁽¹⁶⁰⁾ Os parâmetros clínicos e patológicos considerados para o cálculo do risco de recorrência e progressão são o número de tumores (multiplicidade), a dimensão do tumor, história anterior de recorrência, categoria T (Ta, T1), presença de CIS concomitante e o grau histológico (tabela 3).

Tabela 3 - Fatores de risco de recorrência e progressão baseado no sistema da EORTC⁽¹⁶⁰⁾

Parâmetro	Recorrência	Progressão
Nº de tumores		
1	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Diâmetro do tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Recorrência prévia		
Primário	0	0
≤ 1 rec./ano	2	2
> 1 rec./ano	4	2
Categoria T		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS		
Não	0	0
Sim	1	6
Grau histológico		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Total	0 - 17	0 - 23

Com base na pontuação obtida é possível estratificar os doentes em grupos de risco: baixo risco, risco intermédio e alto risco relativamente à recorrência e progressão da doença não musculo-invasiva (tabela 4).

Tabela 4 - Probabilidade de recorrência e progressão baseado no sistema da EORTC⁽¹⁶⁰⁾

Score para recorrência	Probabilidade 1 ano (IC 95%)	Probabilidade 5 anos (IC 95%)
0	15% (10% - 19%)	31% (24% - 37%)
1-4	24% (21% - 26%)	46% (42% - 49%)
5-9	38% (35% - 41%)	62% (58% - 65%)
10-17	61% (55% - 67%)	78% (73% - 84%)
Score para progressão	Probabilidade 1 ano (IC 95%)	Probabilidade 5 anos (IC 95%)
0	0.2% (0.0% - 0.7%)	0.8% (0% - 1.7%)
2-6	1.0% (0.4% - 1.6%)	6.0% (5% - 8%)
7-13	5.0% (4.0% - 7.0%)	17% (14%, -20%)
14-23	17% (10% - 24%)	45% (35% - 55%)

Um segundo modelo foi desenvolvido com o mesmo objetivo, mas para doentes tratados com BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) intravesical pelo “*Club Urológico Espanhol de Tratamento Oncológico*” (CUETO).⁽¹⁶¹⁾

Tabela 5 - Fatores de risco de recorrência e progressão baseado no sistema da CUETO⁽¹⁶¹⁾

Parâmetro	Recorrência	Progressão
Género		
Masculino	0	0
Feminino	3	0
Idade		
< 60 anos	0	0
60 – 70 anos	1	0
≥ 70 anos	2	2
Recorrência prévia		
Não	0	0
Sim	4	2
Número de tumores		
< 3	0	0
≥ 3	2	1
Categoria T		
Ta	0	0
T1	0	2
CIS		
Não	0	0
Sim	2	1
Grau histológico		
G1	0	0
G2	1	2
G3	3	6
Total	0 - 16	0 - 14

Este “score” é baseado na avaliação de sete fatores de prognóstico: género, idade, história anterior de recorrência, número de tumores, categoria T, CIS associado e grau histológico (tabela 5).⁽¹⁶¹⁾

A estratificação de grupos de risco (baixo risco, risco intermédio e alto risco) é evidente na definição de normas de orientação para o seguimento e terapêutica dos doentes com CUB não musculo-invasivo (Quadro 1).^(36,37)

Quando se aplica o “score” do CUETO, o risco de recorrência encontrado é menor que o obtido pelas tabelas de risco da EORTC. Para a progressão a probabilidade é menor só para os doentes de alto risco.⁽¹⁶¹⁾

Estão definidas pela Associação Europeia de Urologia (EAU) as *Guidelines* orientadoras para os esquemas de vigilância dos doentes com diagnóstico de CUBNMI baseados na probabilidade de recorrência e progressão da doença.^(36,37,160,197,213)

Quadro 1 - Grupos de Risco para o carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo ^(36,37)

Grupos de Risco	Definição	Tratamento recomendado	Seguimento
Baixo Risco	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor primário • Único • Ta BG/G1 • < 3 cm • Sem CIS 	Uma instilação imediata de quimioterapia	Cistoscopia aos 3 meses após RTU-V. Se negativa, a seguinte deve ser realizada aos 9 meses e depois anualmente até aos 5 anos
Risco Intermédio	Categorias entre o baixo risco e risco intermédio	Uma instilação imediata de quimioterapia seguida de instilações de quimioterapia ou BCG durante 1 ano	Seguimento situado entre os dois anteriores, adaptado a fatores individuais.
Alto Risco	Qualquer das seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • T1 • AG/G3 • CIS • Ta G1/G2 (> 3cm e múltiplo e recorrente) 	Instilações de BCG intravesical durante 1 a 3 anos ou cistectomia radical em casos de muito alto risco; Falência da terapêutica com BCG recomenda-se cistectomia radical	Cistoscopia e citologia urinária aos 3 meses após RTU-V. Se ambas forem negativas, este procedimento deve ser repetido cada 3 meses até aos 2 anos, a cada 6 meses até aos 5 anos e anualmente depois dos 5 anos. Recomenda-se controlo imagiológico anual do aparelho urinário superior.

BG – Baixo Grau; CIS – carcinoma *in situ*; AG – Alto Grau; cm – centímetros

Embora cerca de 75% dos carcinomas uroteliais da bexiga sejam diagnosticados como tumores não musculo-invasivos (Ta,T1),⁽²¹⁴⁾ os custos associados ao tratamento dos tumores não musculo-invasivo, pela sua elevada prevalência e curso clínico prolongado, representam custos superiores aos dos tumores musculo-invasivo em estádios mais avançados com necessidade de terapêuticas cirúrgicas radicais e quimioterapia sistémica.^(38,215)

A definição de tumor não músculo-invasivo representa um espectro de doenças com um curso clínico variável, particularmente o T1 apresenta uma heterogeneidade de resposta, mesmo com seguimento e terapêutica adequados. Apesar das ferramentas desenvolvidas para a estratificação do risco de progressão e recorrência em doentes com tumores da bexiga não musculo-invasivo (Ta, T1) e das *Guidelines* publicadas para a orientação terapêutica, com estratégias de gestão clínica adaptadas ao risco,

nomeadamente a vigilância cistoscópica e terapêutica intravesical com o objetivo de preservação da bexiga,⁽²¹⁶⁾ muitos destes tumores progridem para estádios avançados e podem apresentar taxas de recorrência até 50%.⁽²¹⁷⁾

2.11 - Biomarcadores moleculares

Os CUBNMI mostram heterogeneidade no comportamento clínico (que se reflete nas diversas manifestações morfológicas) em resultado das várias alterações moleculares associadas a diferentes fenótipos da doença. Por outro lado, a aplicação dos *critérios clássicos*, clínicos e anatomopatológicos ao CUBNMI tem uma capacidade preditiva limitada no prognóstico individualizado da doença.⁽¹³⁾

O conhecimento dos mecanismos moleculares que estão na génese do cancro^(14,15) levou ao desenvolvimento de um número considerável de biomarcadores moleculares, presentes nas distintas etapas do ciclo celular, com o potencial de estratificar o comportamento biológico e avaliar prospectivamente a agressividade da doença, a probabilidade de recorrência e o risco de progressão teriam impacto no tratamento dos doentes e no prognóstico da doença.^(87,95)

A integração da informação clínica acerca do comportamento da doença com a introdução de biomarcadores moleculares (refletindo o conhecimento da biologia molecular) mostra-se promissora na classificação dos tumores, no prognóstico e na previsão da resposta individual à terapêutica oncológica multimodal.⁽²¹⁸⁾ O reconhecimento de duas vias distintas para a carcinogénese urotelial representa um grande avanço na compreensão e gestão desta doença.^(95,218)

O *Biomarkers Definitions Working Group* define um biomarcador como uma característica celular, bioquímica e / ou molecular (incluindo genética e epigenética) que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica.⁽²¹⁹⁾ Um biomarcador tumoral, em particular, é uma “molécula biológica produzida pela célula tumoral ou por tecidos humanos em resposta à neoplasia que é medida objetivamente e avaliada como um indicador do processo neoplásico”.⁽²²⁰⁾ Alternativamente, um marcador tumoral pode ser definido como uma “molécula que indica a presença de cancro ou fornece informações sobre o provável comportamento futuro de um cancro” (probabilidade de progressão ou resposta à terapêutica).⁽²²¹⁾

Nos últimos anos, a investigação na área da biologia molecular em oncologia foi conduzida em diferentes perspetivas. Por um lado, o mapeamento da resistência das células tumorais à quimioterapia tem como objetivo o desenvolvimento de drogas mais

eficientes. Por outro lado, a possibilidade da caracterização individual do tumor proporciona igualmente o ajuste do tratamento individualizado. Outra perspetiva surge com o desenvolvimento de fármacos dirigidos ao controlo de uma via molecular definida na célula tumoral. Nesse sentido, os biomarcadores tumorais podem ser úteis para: (1) avaliação de risco, (2) rastreio, na deteção precoce do cancro; (3) diagnóstico, (4) prognóstico e (5) seleção e monitorização da terapêutica antineoplásica.⁽²²²⁾

Os *marcadores prognósticos* predizem “o curso natural de um cancro individual, distinguindo tumores com bom prognóstico de tumores com evolução desfavorável e orientam a decisão de quem tratar e/ou o tratamento adequado”.⁽²²³⁾ Os marcadores prognósticos são particularmente importantes no momento do diagnóstico inicial e em doenças neoplásicas que variam amplamente na evolução clínica do doente individual (como no CUBNMI, carcinoma da próstata e cancro da mama e podem ser cruciais tanto na redução do tratamento excessivo em doentes com tumores indolentes, minimizando os efeitos colaterais do tratamento sistémico adjuvante, como para evitar o subtratamento em doentes com doença agressiva. Ainda assim, nos últimos anos, centenas de biomarcadores prognósticos foram propostos, mas poucos progrediram para o uso clínico.^(224,225) No entanto, nenhum marcador de prognóstico poderá prever com precisão o desfecho para um doente individual; fornece antes uma estimativa da probabilidade do resultado para uma população heterogénea de doentes.⁽²²⁵⁾

Biomarcadores preditivos são moléculas que fornecem informações antecipadas sobre se um doente provavelmente beneficiará de uma terapêutica específica.⁽²²⁶⁾ Neste sentido, os biomarcadores preditivos avaliam a probabilidade de o tumor responder à terapêutica farmacológica ou à radioterapia e, assim, permitir que um nível de personalização seja introduzido no tratamento.⁽²²⁷⁾ Apenas um número reduzido de biomarcadores preditivos foram introduzidos na prática clínica com sucesso.⁽²²⁸⁾ Para que um biomarcador seja clinicamente relevante deve constituir um parâmetro *objetivo* preditivo de resposta clínica à terapêutica (ou seja, apenas os doentes que expressam o marcador responderão ao tratamento específico ou responderão em maior grau do que aqueles sem expressão do biomarcador).^(227,229) Os biomarcadores preditivos, ao diferenciar prospectivamente os doentes “*respondedores*” dos doentes “*não respondedores*”, podem orientar a escolha da terapêutica antineoplásica,⁽²²⁹⁾ limitando os efeitos colaterais desnecessários em doentes que não respondem a determinada terapêutica.⁽²²⁵⁾

Do ponto de vista da saúde pública, a introdução de biomarcadores preditivos na prática clínica poderá resultar numa considerável economia de custos (especialmente para as

novas terapêuticas), já que estes medicamentos antineoplásicos seriam usados apenas nos doentes com grande probabilidade de resposta terapêutica.

Idealmente, um biomarcador deve ter as seguintes características: (i) deve ser fácil e rapidamente medido, não muito caro; (ii) deve ser extraído de fontes prontamente disponíveis, como sangue ou urina; (iii) deve ter alta sensibilidade e alta especificidade; (iv) os seus níveis devem variar rapidamente em resposta ao tratamento; (v) o nível basal deve permitir uma estratificação de risco e avaliação prognóstica; (vi) deve estar ligado à fisiopatologia do tumor, sobretudo em termos de evolução.⁽²²¹⁾

Com vimos, um biomarcador deve ter sensibilidade e especificidade elevadas e apresentar elevado valor preditivo, mas, até ao momento, não dispomos de nenhum biomarcador molecular para o CUB que consiga integrar todas estas características. Além disso, os resultados dos ensaios de validação sugerem que nenhum biomarcador individualmente poderá prever os *outcomes* no CUB.^(87,95,218) A combinação de vários biomarcadores poderá permitir uma maior precisão preditiva da evolução clínica do tumor não músculo-invasivo em estádios precoces da doença.⁽²¹⁸⁾

Nos últimos anos foram apontados numerosos biomarcadores com potencial aplicação clínica, associados a alterações a nível molecular que incluem vários genes supressores tumorais, oncogenes, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, receptores hormonais, marcadores de proliferação celular e de apoptose, moléculas de adesão celular e oncoproteínas.⁽²¹⁸⁾

Os biomarcadores representativos dos vários aspetos da biologia tumoral podem genericamente classificar-se como:

- a) Marcadores de proliferação celular;
- b) Reguladores do ciclo celular;
- c) Modeladores da apoptose;
- d) Fatores de transdução de sinal e crescimento celular.
- e) Moléculas modeladoras da matriz extracelular/ diferenciação celular;
- f) Reguladores da angiogénese;

2.11.1 - Marcadores de proliferação celular

2.11.1.1 - Ki-67/PCNA

O Antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* – PCNA) é um biomarcador de proliferação celular. Trata-se de uma proteína nuclear que ativa a

polimerase do DNA. O *índex* PCNA correlaciona-se positivamente com o grau histológico e o estágio tumoral. É apontado como um marcador de prognóstico potencialmente útil no CUB.⁽²³⁰⁾

Outro marcador molecular de proliferação celular mais amplamente utilizado é o Ki-67 que se expressa nas células em proliferação. Exibe reatividade em cortes de tecidos fixados em formalina ou embebidos em parafina. O Ki-67 é um anticorpo monoclonal que reconhece um antígeno nuclear humano expresso nas fases S, G1, G2 e M do ciclo celular, mas está ausente na fase G0. É avaliado pelo número de células imunorreativas em cortes de tecidos fixados com formol e conservados em parafina e também em cortes de congelação. É apontado como um biomarcador de valor prognóstico preditivo de recorrência no CUB. Correlaciona-se com o grau histológico e o estágio.^(231,232)

A expressão aumentada do Ki-67 está, no entanto, associada a estádios mais avançados, invasão linfovascular e a metástases ganglionares.⁽²¹⁸⁾ Nestes casos, a expressão do Ki67 $\geq 20\%$ (percentagem de células marcadas, isto é, que exibem o biomarcador) está associada a um aumento da recorrência da doença, verificado em estudos multicêntricos.⁽²³¹⁾

Por outro lado, uma expressão baixa de Ki-67 associa-se ao aumento da sobrevida livre de progressão tumoral. *Bertz et al*, no estudo de 309 doentes com o diagnóstico de CUBNMI (pT1), apontam a expressão do Ki-67 como o único marcador significativamente correlacionado com a sobrevida livre de progressão da doença.⁽²³³⁾

Potencialmente, permite a monitorização da resposta à terapêutica em “*tempo real*” pela comparação da expressão do Ki-67 em diferentes fases da terapêutica num mesmo doente, constitui um indicador útil na avaliação da resposta ou resistência ao tratamento e também no prognóstico da doença.⁽²³⁴⁾

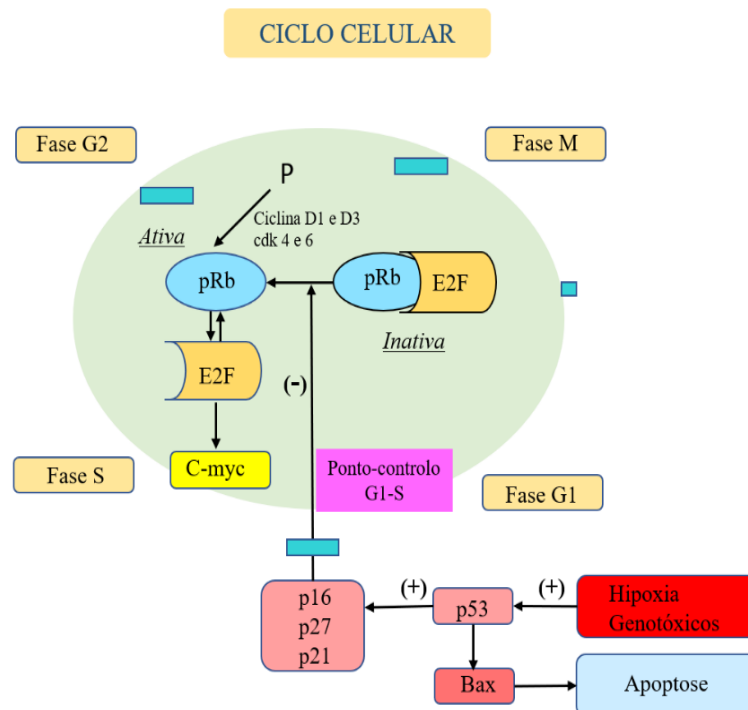


Figura 13 – Biomarcadores moleculares – relação com o ciclo celular

A compreensão da biologia do tumor e dos mecanismos moleculares da doença permitiu o desenvolvimento de biomarcadores. As moléculas produzidas pelas células do tumor podem ser detetadas e medidas em material biológico dos doentes. A sua expressão alterada é representativa das características do tumor.

2.11.2 - Marcadores do ciclo celular

Como vimos anteriormente, o ciclo celular consiste num conjunto de passos coordenados e regulados para a proliferação celular fisiológica e fornece a chave para a compreensão da proliferação não controlada no cancro (figura 13).⁽⁸⁹⁾

Um gene supressor tumoral ou anti-oncogénese *bloqueia* a célula na progressão do processo tumoral, geralmente inibindo um passo específico do complexo processo que leva à ocorrência da neoplasia a partir de células “normais”. A mutação num gene supressor, com diminuição ou perda de função, abre caminho para a possibilidade de ocorrência de CUB.⁽⁹⁵⁾

2.11.2.1 - RB/pRB

A pRB é uma proteína de 105 kD codificada pelo gene *RB* no cromossoma 13q14 que regula a transcrição genética em todas as células, com capacidade de supressão da expressão de genes necessários à progressão do ciclo celular.⁽²¹⁸⁾ Desempenha um

papel fundamental na regulação, manutenção, diferenciação e desenvolvimento das *stem cells*. A perda de função do gene *RB* está presente em 30% dos casos de carcinoma urotelial de alto grau. A expressão alterada da pRB está associada a diminuição da sobrevida em doentes com carcinoma urotelial.⁽²³⁵⁾ No entanto, o valor preditivo da expressão alterada de pRB é inferior ao de outros biomarcadores do ciclo celular tanto para o CUBNMI como para o CUBMI.^(236,237)

2.11.2.2 - *TP-53* / p53

O gene *TP-53* está localizado no braço curto do cromossoma 17 (17p13.1) e codifica a proteína p53 que desempenha um papel central no ciclo celular, inibindo a passagem à fase S.^(218,238) Esta proteína funciona igualmente como reguladora da apoptose à semelhança do Bax.

A mutação ou inativação do *TP-53* é comum em muitas neoplasias humanas causando desregulação na proliferação celular. No CUB as mutações do gene *TP-53* ocorrem em cerca de 50% dos casos, especialmente nos estádios avançados.⁽²³⁹⁾ A mutação genética do *TP-53* leva à síntese de uma proteína anómala, geralmente com aumento da semivida, permitindo a deteção de p53 por métodos de imunohistoquímicos.⁽²⁴⁰⁾

A sobre expressão do p53 associa-se a mau prognóstico, mas algumas mutações resultam na ausência de acumulação da proteína o que resulta num “falso-negativo”. Nos CUBNMI, o p53 é um biomarcador prognóstico de recorrência em tumores de baixo grau e de progressão em tumores de alto grau.⁽⁹⁶⁾ Num estudo com doentes com CUBNMI, pT1N0, a expressão do p53 esteve alterada em 25% dos doentes, sendo um fator de recorrência e de mortalidade específica.⁽²⁴¹⁾

Considerando um *cutoff* de 20%, verificou-se nos CUB pT1, que os tumores com expressão de p53 > 20% têm maior probabilidade de progressão.⁽²⁴²⁾

2.11.2.3 - p21

O biomarcador p21 é uma proteína de 21 kD codificada pelo gene *CDKN1A* que inibe as cinases dependentes da ciclina (CDKs) responsáveis pela iniciação da fase G1 no ciclo celular, portanto, funciona como regulador da progressão do ciclo celular no *checkpoint* G1.⁽¹⁹¹⁾

Nos tumores não invasivos, a expressão alterada de p21 está associada a recidiva tumoral e diminuição da sobrevida.^(96,240) Em doentes com CUBMI, a expressão de p21

é um preditor independente da recorrência e mortalidade específica.⁽²⁴¹⁾ Em doentes com doença confinada ao órgão, o p21 foi indicado como um fator independente associado à recorrência da doença e à morte específica quando combinado em análise multivariável.⁽²⁴³⁾ No entanto, outro estudo realizado por *Shariat et al.*, envolvendo 80 doentes apenas com CUBNMI, pT1, verificou que o p21 não era um marcador preditivo independente para recorrência da doença ou para mortalidade específica pela doença.⁽²⁴⁴⁾

A associação de p21 alterado com alterações na expressão de p53 aumenta o risco de recorrência e mortalidade em doentes com CIS.^(96,239)

2.11.2.4 - p27

A proteína p27 é um membro da família *CIP/KIP* de inibidores da cinase dependente da ciclina (CDK), que atuam inibindo a atividade da ciclina *D* e da ciclina *E* impedindo a progressão da célula na fase G1. Níveis aumentados de p27^{Kip1} servem como uma barreira para a progressão para a fase S. Por outro lado, níveis decrescentes de proteína de p27^{Kip1} estão associados a fenótipos celulares mais agressivos com aumento da recorrência e mortalidade específica.^(245,246)

Assim, a expressão alterada de p27 no CUB associa-se a um aumento da mortalidade específica em doentes no estágio pT1, embora o potencial preditor deste biomarcador seja limitado. Na doença músculo-invasiva a expressão aumentada de p27 está associada à recorrência, progressão da doença e mortalidade específica da doença.⁽⁹⁶⁾

2.11.2.5 - Ciclinas D1 e D3

As ciclinas são assim chamadas porque a sua síntese varia periodicamente durante o ciclo celular, sendo degradadas logo após a sua *utilização*. Ligam-se às cinases dependentes da ciclina (CDKs) para atuarem na regulação do ciclo celular e na proliferação, interagindo com a pRB e outras proteínas do ciclo celular, como o p21.⁽¹⁶⁷⁾

A ciclina D1 é uma proteína nuclear codificada pelo gene *CCND1* no cromossoma 11p13. Apresenta uma variação de expressão nas diferentes fases do ciclo celular, refletindo o seu papel regulador na divisão celular. A ciclina D1 funciona como um sensor *mitogénico* e ativador de CDK 4/6, sendo um dos reguladores do ciclo celular mais frequentemente alterados nos processos de carcinogénese. O urotélio normal e displásico não expressam ciclina D1. A sobre expressão da ciclina D1 foi encontrada

em 81% de carcinomas não-musculo-invasivos e em 38% de carcinomas músculo-invasivos. Apesar da expressão da ciclina D1 se encontrar frequentemente aumentada nas células tumorais, a sobre expressão não é suficiente para determinar a transformação oncogénica.⁽²⁴⁷⁾

A ciclina D3 é outra proteína reguladora da fase G1-S do ciclo celular. O gene da ciclina D3 está mapeado no cromossoma 6p21 e codifica uma proteína de 35 kD que partilha 53% de homologia de sequência com ciclina D1 mas é induzida mais tarde, na fase G1, do ciclo celular.^(167,248,249) A expressão anormal da ciclina D3, foi documentada em várias neoplasias humanas. No CUB, a expressão aumentada de ciclina D3 associa-se a dimensão elevada do tumor (> 5 cm) e aumento da proliferação, sugerindo pior prognóstico.^(218,250)

2.11.3 - Modeladores da apoptose

A apoptose é a forma de morte celular programada que complementa a proliferação celular na manutenção homeostase normal dos tecidos. Este processo é controlado por múltiplas vias de sinalização em resposta a fatores intracelulares e extracelulares, resultando na sobrevivência ou morte celular. É também através da apoptose que as células que apresentam alterações genéticas estruturais e/ou funcionais são eliminadas após o controle nos pontos de verificação (*checkpoints*) durante o ciclo celular. Alterações na integridade funcional deste complexo sistema homeostático, resultando na supressão da morte celular programada, constitui uma das características das células neoplásicas.^(15,88)

2.11.3.1- Bcl-2

O biomarcador Bcl-2 é um proto oncogene que codifica uma proteína de membrana da mitocôndria que bloqueia a apoptose sem influenciar a proliferação celular.⁽²¹⁸⁾ Um aumento da expressão de Bcl-2 pode resultar em proliferação celular.⁽²⁵¹⁾ A imunorreatividade do Bcl-2 é observada no urotélio normal, na displasia e em cerca de 80% dos casos de carcinoma urotelial, sendo negativo no carcinoma *in situ*, o que permite diferenciar estas lesões.^(252,253) A expressão do Bcl-2 encontra-se diminuída em CUB de alto grau e em estádios avançados da doença.⁽²⁵²⁾

Nos doentes tratados com radioterapia, a expressão aumentada de Bcl-2, após o tratamento, correlaciona-se com o aumento de recorrência tumoral e com o aumento da mortalidade específica.⁽²¹⁸⁾

2.11.3.2 - Bax

Outro biomarcador da apoptose é o Bax (proteína X associada ao Bcl-2) que tem sido apontado como um biomarcador independente de sobrevivência no CUB cuja expressão se correlaciona com alto grau e estágio avançado.⁽²⁵²⁾ A expressão aumentada de Bax promove a morte celular.⁽²⁵¹⁾

Ajili et al., num estudo com o objetivo de avaliar o valor prognóstico o aumento da expressão do Bax e Bcl-2 relativamente à recorrência em doentes com CUBNMI pT1 após imunoterapia com BCG, concluiu que a expressão aumentada destes biomarcadores se correlaciona com o aumento significativo do risco de recorrência após o tratamento, sendo um fator independente na análise multivariável.⁽²⁵⁴⁾

2.11.3.3 - Caspase - 3

O nome "caspase" significa cysteine-aspartic-acid-proteases representa uma família de endoproteases reguladoras dos mecanismos celulares que controlam a inflamação e morte celular programada. Embora mais frequentemente associadas com apoptose, um dos principais tipos de morte celular programada, tem havido evidência crescente de que algumas destas enzimas também podem influenciar a proliferação e estar associadas à progressão do CUB.⁽²⁵⁵⁾

A sobre expressão da caspase 3 correlaciona-se com o desenvolvimento de CUBMI em doentes com carcinoma "*in situ*".⁽²¹⁸⁾ Por outro lado, na doença músculo-invasiva, a perda de expressão da caspase 3 relaciona-se com a ocorrência de doença metastática e é um fator de prognóstico independente preditor de mortalidade específica após a cistectomia.⁽⁹⁶⁾

2.11.4 - Fatores de transdução de sinal e crescimento celular

2.11.4.1- ErbB-2/HER-2

O recetor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER-2) é um recetor de tirosina-cinase transmembranar da família de recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também conhecida como a família ErbB, uma classe de proto oncogenes do recetor tirosina cinase. A família de EGFR inclui o HER1 (EGFR e ErbB1), HER2 (ErbB2 e HER2/neu), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4).⁽²⁵⁶⁾

Desempenham um papel importante em vários processos celulares, como proliferação celular, migração, adesão e, potencialmente, na transformação celular, incluindo a carcinogénese urotelial. O ErbB-2 desempenha um papel fundamental no crescimento celular, sobrevivência e migração. A ativação anormal do ErbB-2 tem sido apontada como um evento presente na transformação oncogénica. O papel do HER-2 está bem estudado no cancro da mama, onde a expressão aumentada de HER-2 ocorre em 18% a 22% dos casos e correlaciona-se com um mau prognóstico. No CUB, o aumento do risco de progressão da doença relaciona-se com aumento da expressão do HER2 ou EGFR pelas células do tumor.^(257,258)

2.11.5 - Marcadores de diferenciação celular

2.11.5.1 - CD44

O CD44, uma glicoproteína transmembrana, cuja expressão está aumentada em vários tipos de células, incluindo nas *stem cells* cancerígenas. Frequentemente, mostra variantes alteradas implicadas na progressão tumoral. O ácido hialorónico, liga-se ao CD44, resultando na ativação de vias de sinalização celular que induzem a proliferação celular, a sobrevivência celular, promove também alterações do citoesqueleto e aumento da motilidade celular. Os diferentes papéis funcionais das isoformas do CD44 (CD44s e CD44v) não são totalmente compreendidos. A expressão de CD44v observa-se em tumores metastatizados, enquanto a mudança entre CD44v e CD44s pode desempenhar um papel na regulação da transição epitelial mesenquimatosa e na plasticidade adaptativa das células cancerígenas.^(259–261) O impacto clínico-patológico do CD44 e das suas isoformas na promoção da carcinogénese sugerem que pode ser um alvo molecular para a terapêutica anticancerígena.^(259,262–264) A expressão do CD44 no urotélio normal só se verifica nas células da camada basal. A perda de

imunorreatividade de CD44 e aumento da positividade de CK20 estão associados com o aumento do grau e o estágio do tumor. A imunorreatividade para os marcadores CK20 e CD44 está significativamente relacionada como grau da classificação da OMS/ISUP. Os resultados de alguns trabalhos de investigação sugerem a sua utilidade potencial na previsão do comportamento biológico do CUBNMI (Ta e T1).^(144,265,266)

2.11.5.2 - CK 5/6 e CK 20

A *família* das citoqueratinas é constituída por um amplo espectro de filamentos intermediários com expressão nas células epiteliais e mesoteliais humanas.^(267,268)

No urotélio vesical é possível identificar diferente citoqueratinas por métodos imunohistoquímicos com expressão nas diferentes camadas celulares do urotélio normal.^(265,268–270) Especificamente, a CK20 é fisiologicamente expressa por células da camada superficial (*umbrella cells*) e algumas células intermediárias isoladas, enquanto a expressão da CK 5/6 está limitada às células da camada basal.^(268–271)

Os padrões de expressão de algumas citoqueratinas, como o CK20 e a CK5/6, provaram ser úteis na predição do comportamento biológico das lesões neoplásicas da bexiga, nomeadamente no CUBNMI.^(174,265,268,271–273) O CK 5/6 é um biomarcador de diferenciação celular cuja diminuição da expressão mostrou valor preditivo da recorrência do tumor urotelial da bexiga, apresenta correlação com a progressão da doença.⁽²⁶⁸⁾ Nos CUB a análise da distribuição topográfica do CK20 é útil como preditor da evolução clínica, estando uma distribuição difusa ou ausência de expressão associada a pior prognóstico. Em tumores de baixo grau uma expressão normal está associada a baixa taxa de recorrência.⁽²⁷⁴⁾

No quadro 2 apresentamos de forma resumida os biomarcadores moleculares estudados nas células do tecido tumoral dos doentes que foram selecionados para o nosso estudo, referido as vias moleculares alteradas e o impacto prognóstico.⁽¹¹⁵⁾

Quadro 2 - Biomarcadores incluídos no estudo do carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo.

Biomarcador	Função normal	Via alterada	Impacto prognóstico
Proliferação celular			
Ki-67/MIB1***	Proliferação celular		Elevado, pior prognóstico
Ciclo celular			
p53 (TP53)*	Inibe a progressão G ₁ -S	p53	Recorrência aumentada; diminuição da sobrevida
p21**	Inibidor CDKs	p53	Recorrência aumentada; diminuição da sobrevida
p27**	Inibidor CDKs	Rb	Diminuição da sobrevida
Ciclina D1***	Modelador CDKs	p53	Recorrência aumentada
Ciclina D3***	Modelador CDKs	p53	Recorrência aumentada; diminuição da sobrevida
Apoptose			
Bax**	Promove a apoptose	Intrínseca da apoptose	Diminuição da sobrevida, mau prognóstico
Bcl-2***	Inibidor da ativação das caspases	Intrínseca da apoptose	Diminuição da sobrevida, mau prognóstico com terapêutica adjuvante
Caspase - 3 **	Promove a apoptose	Apoptose	Recorrência aumentada
Crescimento celular			
ErbB-2***	Recetor do fator de crescimento epidérmico	Ras-MAPK, PI3K-Akt	Diminuição da sobrevida
Diferenciação celular			
CD44*	Diferenciação celular	Adesão celular	Diminuição da sobrevida
CK 5/6*	Diferenciação celular		Recorrência aumentada; diminuição da sobrevida
CK20*	Diferenciação celular		Recorrência aumentada; diminuição da sobrevida

* Alterado, ** Diminuição da expressão, *** Aumento da expressão

3. Hipótese e objetivos de Investigação

3. Hipótese e objetivos de Investigação

3.1 - Hipótese de investigação

O carcinoma urotelial da bexiga engloba um grupo heterogêneo de tumores com diversas características clínicas, histopatológicas, biológicas e moleculares. Com base na evidência clínica e nos resultados da investigação genética surge a noção de que há duas vias genéticas distintas que levam ao carcinoma urotelial da bexiga. A melhor compreensão da biologia molecular e das alterações da biologia urotelial poderá contribuir para uma melhor classificação, avaliação do prognóstico e seleção do tratamento personalizado dos doentes com carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo.

Assim, a hipótese de investigação no nosso estudo é a seguinte:

A evolução clínica do carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (recorrência, progressão e morte específica pela doença) poderá ser prevista pelo padrão de expressão de biomarcadores moleculares nas amostras do tumor obtidas por ressecção transuretral da bexiga (RTU-V).

3.2 - Objetivos de investigação

Tendo como linha de orientação a hipótese de investigação deste estudo, definimos objetivos gerais e específicos.

3.2.1 - Objetivos gerais

- 1) Investigar entre os biomarcadores aqueles que apresentam valor preditivo na evolução clínica do carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1).
- 2) Investigar nos doentes com carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1) a aplicação da classificação do fenótipo molecular (basal, luminal, misto e nulo) e avaliar o valor preditivo no prognóstico da doença.
- 3) Desenvolver um modelo de risco personalizado para os doentes com carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo integrando fatores de prognóstico clínicos, histopatológicos e a expressão de biomarcadores moleculares.

3.2.2 - Objetivos específicos

A definição dos objetivos gerais do nosso estudo leva à necessidade de definir objetivos específicos que permitam concretizar respostas que suportem a hipótese de investigação.

Assim, de forma a concretizar os objetivos gerais anteriormente definidos, definimos os seguintes objetivos específicos:

- Objetivos específicos relacionados com o objetivo geral 1):

1.1) Avaliar a expressão dos biomarcadores das diversas vias oncogénicas estudadas por imunohistoquímica;

1.2) Relacionar a expressão dos biomarcadores moleculares com a recorrência, progressão e morte específica da doença;

1.3) Avaliar o valor preditivo dos biomarcadores estudados na recorrência, progressão e morte específica pela doença.

- Objetivos específicos relacionados com o objetivo geral 2):

2.1) Avaliar a expressão dos fenótipos moleculares por imunohistoquímica nos doentes com carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo;

2.2) Relacionar a expressão dos fenótipos moleculares com a recorrência, progressão e morte específica da doença;

2.3) Avaliar o valor preditivo da classificação molecular do carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo na recorrência tumoral, progressão e morte específica da doença.

- Objetivos específicos relacionados com o objetivo geral 3):

3.1) Avaliar e seleccionar os fatores de prognóstico clínicos, histopatológicos e a expressão de biomarcadores moleculares com valor preditivo de recorrência, progressão e morte específica nos doentes com carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo;

3.2) Integrar os fatores de prognóstico com valor preditivo na estratificação do risco de recorrência, progressão e morte específica nos doentes com carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo;

3.3) Avaliar a utilidade na prática clínica do modelo de risco personalizado nos doentes com o diagnóstico de carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo na recorrência tumoral.

4. Materiais e Métodos



4. Materiais e métodos

Na preparação e desenvolvimento de um projeto de investigação está subjacente um processo de tomada de decisão pelo investigador relativamente à metodologia a seguir na abordagem ao problema em estudo. No processo de tomada de decisão são determinantes a natureza do problema e os objetivos definidos para o estudo, assim como, as posições conceptuais e metodológicas do investigador. A seleção dos métodos, do objeto e das variáveis do estudo e ainda das técnicas e procedimentos adotados deve, assim, ser ponderada, refletida, discutida e avaliada, pois as decisões tomadas irão condicionar a natureza e a qualidade da informação a que se acede, os dados que se obtêm e, em última análise, a compreensão do objeto do estudo.

Neste capítulo daremos a conhecer as opções metodológicas assumidas na presente investigação, as quais se alicerçam no quadro conceptual da prática clínica na abordagem ao CIBNMI, em função do qual se poderão ler os dados obtidos para, a partir destes, se fazem inferências.

O reconhecimento da importância da inferência probabilística em matéria de diagnóstico, tratamento e prognóstico de doentes individuais justifica o aumento do interesse nas abordagens de investigação epidemiológica como meio de potenciar a medicina baseada na evidência.

A epidemiologia clínica pode ser descrita como a aplicação ao indivíduo doente dos princípios e dos métodos da epidemiologia. Estes termos correspondem à aplicação de princípios, métodos epidemiológicos e técnicas estatísticas para o estudo de problemas clínicos tendo como objetivo a melhoria dos cuidados de saúde baseados na evidência. Enquanto a epidemiologia geral estuda a distribuição da ocorrência e determinantes dos estados de saúde e doença em populações humanas, a epidemiologia clínica ocupa-se especificamente da prática clínica através do estudo da variação e dos determinantes da evolução da doença. As populações alvo em epidemiologia clínica são grupos de indivíduos doentes.⁽²⁷⁵⁾

Os métodos da biologia molecular e da genética têm sido utilizados em epidemiologia clínica nas áreas do diagnóstico, rastreio, estratificação de risco, prognóstico e escolha de tratamentos. É um domínio da investigação com um potencial elevado no contributo para a saúde cuja aplicação exige, no entanto, competências interdisciplinares.

Os estudos de prognóstico são naturalmente estudos de coorte, de preferência desde o primeiro evento, geralmente o diagnóstico ou o início do tratamento (*inception cohort*), mas com métodos de análise de sobrevivência (análise de Kaplan-Meier e de incidência

cumulativa), identificação de fatores de risco na evolução da doença (prognóstico) e probabilidade de eventos ao longo do tempo e tempos censurados. Os fatores de prognóstico são características da doença (estadiamento do tumor, expressão de biomarcadores moleculares) ou do tratamento (tipo e/ou dose do medicamento, esquema terapêutico).⁽²⁷⁶⁾ Os estudos de coorte constituem a melhor opção de investigação clínica quando a experimentação não é possível, sendo os mais poderosos a produzir evidência a seguir ao ensaio experimental aleatorizado e controlado.^(277,278) Estes estudos de coorte apresentam ainda a vantagem acrescida de grande validade externa dado serem aplicados na prática clínica habitual.⁽²⁷⁹⁾

O estudo que se propõe é um estudo de coorte clínico de doentes com o diagnóstico de carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1) avaliados retrospectivamente por um período de até 120 meses após o estabelecimento do diagnóstico por critérios histopatológicos de forma a avaliarem-se fatores de prognóstico relativamente aos *outcomes* no final do período de seguimento.

Os resultados de interesse primário para o estudo são a recorrência e o tempo até à primeira recorrência da doença, a progressão e o tempo até à progressão da doença, a ocorrência de morte específica pela doença e o tempo até à ocorrência da morte específica da doença.

Assim, este projeto de investigação tem por base um estudo observacional retrospectivo de uma coorte clínica constituída por 147 doentes com o diagnóstico de carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo (Ta e T1) recrutados no serviço de urologia do Hospital Reina Sofia em Córdoba entre 2002 e 2014.

4.1 - Critérios de inclusão/exclusão dos doentes no estudo

Relativamente aos critérios de seleção dos doentes (inclusão/exclusão) foram incluídos no estudo doentes de ambos os sexos, com diagnóstico de CIBNMI (Ta e T1) com idades compreendidas entre os 31 e os 89 anos.

Os critérios de exclusão dos doentes para o presente estudo são: história prévia de carcinoma urotelial da bexiga ou do urotélio alto ou presença concomitante de CIS. Foram também excluídos os doentes com o diagnóstico de neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno e proliferação urotelial de potencial maligno incerto. Também foram excluídos os doentes que apresentam história de outra patologia oncológica anterior com potencial influência no resultado do estudo.

4.2 - Procedimentos

Em todos os casos selecionados para o estudo, o diagnóstico foi comprovado pelo estudo histopatológico da peça operatória obtida por ressecção transuretral do tumor vesical (RTU-V).

Em todos os doentes (exceto se apresentavam contraindicações) foi feita instilação vesical de mitomicina C (40 mg/40 ml) nas primeiras 24 horas após a RTU-V. Respeitando a classificação de risco da EORTC, aos doentes com tumores de baixo risco (TaBG, solitários, diâmetro < 3 cm) não foi feita qualquer outra terapêutica adjuvante. Nos doentes com tumores de risco intermédio (TaAG, diâmetro > 3 cm ou multifocais) foi implementada terapêutica adjuvante com mitomicina C (40 mg/40ml): uma instilação vesical semanal durante 6 semanas. Os doentes com tumores de alto risco (T1AG, multifocais) fizeram terapêutica adjuvante com instilações vesicais com BCG: uma instilação por semana durante 6 semanas seguindo o protocolo do serviço de urologia e respeitando as *Guidelines* da EAU à data do tratamento.⁽²⁸⁰⁾

O seguimento dos doentes após a RTU-V foi estratificado segundo as categorias de risco (*score* EORTC). Nos tumores de baixo risco foi feita cistoscopia aos 3 meses e aos 9 meses após a RTU-V, depois anualmente até ao encerramento do estudo. Os doentes com tumor de risco intermédio fizeram cistoscopia de 4/4 meses durante o primeiro ano, de 6/6 meses no segundo e terceiro anos e depois anualmente até ao encerramento do estudo. Nos doentes com tumores de alto risco foi feita cistoscopia de 3/3 meses durante os dois primeiros anos, durante o terceiro de 4/4 meses e após o terceiro ano de 6/6 meses até ao encerramento do estudo. Nos casos em que se verificou recorrência ou progressão, o protocolo de seguimento foi reiniciado após o evento. O tempo de seguimento dos doentes, em meses, é contado a partir da data do primeiro diagnóstico histopatológico (*baseline*).

Os registos da informação clínica: idade, sexo, dimensão do tumor, recorrência (sobrevida livre de recorrência), progressão (sobrevida livre de progressão), grau histológico (OMS, 2004/2016) e estágio T (Ta e T1) constam do registos do serviço de urologia e constituem uma base de dados anonimizada e são propriedade do grupo de investigação dirigido pelo Professor Antonio Lopez-Beltran, co-orientador da tese de doutoramento, integrada em projetos de investigação da Universidade de Córdoba, financiados pelo Governo de Espanha [apoiado em parte pela subvenção PI17/01981 FIS (Ministério da saúde), Madrid, Espanha] e das unidades de Urologia e Anatomia Patológica da Fundação Champalimaud.

Numa primeira fase procedeu-se à recolha de dados clínicos e anatomopatológicos que se referem ao momento do diagnóstico da doença (RTU-V) e à posterior evolução clínica, nomeadamente a ocorrência de recorrência da doença, tempo de sobrevivência livre de recorrência, ocorrência de progressão, sobrevida livre de progressão e mortalidade específica da doença.

Foram utilizadas as metodologias laboratoriais convencionais para caracterização histopatológica, nomeadamente caracterização do grau histológico e estágio T (Ta e T1) das lâminas e das peças cirúrgicas dos tumores da bexiga armazenados em blocos de parafina. Nos casos com critérios de inclusão neste projeto de investigação foi feito o estudo da expressão dos biomarcadores no tecido tumoral colhido por RTU-V e armazenados nos blocos de parafina. Esta fase do estudo foi orientada pelo Professor António Lopez-Beltran e contou com a colaboração especializada dos técnicos de anatomia patológicas e dos médicos anatomopatologistas especializados em uropatologia.

Foram obtidas preparações para análise dos biomarcadores através de secções muito finas, de cerca de 4 µm, a partir do material incluído em parafina e colocadas em lâminas de vidro. Desta forma, é possível localizar os antígenos mantendo a arquitetura original do tecido.

As técnicas laboratoriais para deteção e análises dos biomarcadores foram técnicas de imunohistoquímica que utilizam a reação anticorpo-antígeno para a deteção e quantificação de moléculas no seu local de origem. Esta ligação permite identificar a presença de variadas substâncias nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada aos complexos antígeno-anticorpo entretanto formados.

A imunohistoquímica constitui um meio de identificação *in situ* de várias estruturas celulares e tecidulares que podem estar diretamente associadas a patologias. Apresenta vantagens relativamente a outras técnicas mais recentes de análise molecular que são mais complexas, mais caras e fornecem informação demasiado detalhada e complexa, de difícil aplicabilidade na prática clínica.⁽²⁸¹⁾ As limitações da técnica relacionam-se com a falta de concordância entre as diversas técnicas de imunohistoquímica e outros testes moleculares. As técnicas de imunohistoquímica, com base em avaliações semi-quantitativas, estão dependentes de múltiplas variáveis como a escolha do anticorpo, a técnica de fixação, os métodos de coloração, os métodos de deteção de sinal e ainda com os critérios de avaliação de coloração positiva. A padronização destes critérios constitui um desafio na aplicação clínica de imunohistoquímica no estudo dos biomarcadores no carcinoma urotelial da bexiga.⁽²¹⁸⁾

4.3 - Variáveis independentes

Relativamente à operacionalização das variáveis no presente estudo, distinguimos as variáveis que representam os fatores de prognóstico – variáveis independentes – das variáveis que representam os resultados do estudo – variáveis dependentes.

Num estudo de coorte devemos distinguir entre fatores de risco e fatores de prognóstico. Assim, podemos definir como fatores de risco fatores associados ao resultado de incidência de doença que ocorrem antes dela se manifestar, ou seja, numa coorte de indivíduos saudáveis, enquanto fatores de prognóstico são fatores associados à incidência de um qualquer resultado de saúde manifestado numa coorte de doentes.^(278,282)

Como variáveis independentes que caracterizam a amostra em estudo foram definidas: sexo, idade, diâmetro do tumor, estágio, grau histopatológico e a expressão de biomarcadores moleculares no tecido tumoral.

Para além dos fatores sociodemográficos, sexo e idade, avaliados no momento do diagnóstico de tumor vesical, outros fatores sócio demográficos, embora presentes na informação clínica dos doentes, não foram considerados no nosso estudo, nomeadamente a residência uma vez que todos os doentes admitidos para estudo eram residentes na área de influência do Hospital Reina Sofia de Córdoba entre 2002 e 2014.

Assim, fatores como exposição ao fumo do tabaco e exposição profissional a carcinogénios não foram considerados como variáveis de estudo uma vez que o objetivo da investigação não comporta os fatores de risco prévios ao diagnóstico, embora sejam fatores de risco clássicos na carcinogénese urotelial.

As variáveis sociodemográficas consideradas no estudo foram a idade, medida em anos completos na altura do diagnóstico, e o sexo masculino ou feminino. A idade, inicialmente uma variável contínua, foi transformada em variável categórica para análise e foram considerados dois grupos para análise, os doentes com idade inferior a 70 anos e os doentes com idade superior ou igual a 70 anos com base nos resultados apontados pela revisão da literatura.^(283,284)

A variável anatómica referente ao tumor vesical considerada para o estudo foi a dimensão (diâmetro) do maior tumor vesical (quando múltiplo), avaliado em centímetros, por ecografia pré-operatória. Esta variável foi também transformada numa variável categoria nominal para efeitos de análise tendo sido considerados dois grupos: os doentes cujo maior tumor avaliado era inferior a três centímetros e os doentes cujo tumor

de maiores dimensões era igual ou superior a três centímetros com base nos resultados encontrados na literatura.

As variáveis histopatológicas consideradas para o estudo foram estágio (Ta ou T1) e o grau histopatológico (alto grau ou baixo grau).

Em cada um dos casos foram obtidas secções dos blocos de parafina das áreas menos diferenciadas do tumor. A reavaliação do diagnóstico histopatológico de todos os tumores primários e das recorrências foi efetuada por três patologistas, sem conhecimento do diagnóstico anterior e das informações clínicas referente a cada caso. Trinta casos de carcinoma urotelial da bexiga selecionados aleatoriamente serviram como teste preliminar para facilitar o acordo sobre o diagnóstico em grau histológico e estágio (Ta e T1). Nos casos em que se verificou discrepância no resultado foi feita revisão para obter consenso no diagnóstico histopatológico.

O grau e o estágio foram revistos de acordo com a classificação da OMS 2004/2016 e da AJCC/TNM (American Joint Committee of Cancer/Tumor-Node-Metastasis), revisão de 2016,^(12,150,156) classificando os tumores numa das categorias consideradas na variável categórica “estágio”: Ta ou T1; relativamente ao grau histológico, cada um dos tumores foi classificado como “alto grau” ou “baixo grau” e a variável “Grau” para análise definiu duas categorias: “alto grau” ou “baixo grau”, respetivamente para o carcinoma urotelial de alto grau e carcinoma urotelial de baixo grau.

Para o estudo dos biomarcadores tumorais, o material biológico estudado nos 147 doentes foi obtido dos blocos de parafina dentro dos quais o tecido tumoral estava preservado. Para a preparação das lâminas para avaliação dos biomarcadores nos tecidos tumorais conservados em blocos de parafina, selecionamos um bloco de parafina representativo de cada tumor que foi cortado em secções de 4 µm de espessura, desparafinadas em xileno, reidratadas em etanol graduado e lavadas durante 5 minutos com tampão fosfato salino. Para a recuperação do antígeno, as secções assim obtidas foram imersas em solução tampão de citrato – 10mM (pH 6,0) e aquecidas a 100°C. A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas durante 30 minutos com peróxido de hidrogénio a 3% em metanol.

As secções foram então incubadas com os anticorpos monoclonais que estão referenciados no quadro 3 segundo o protocolo fornecido pelo fabricante para cada biomarcador, incorporando controlos positivos e negativos.

A marcação por imunohistoquímica foi executada usando o *polymer-based system* (enVision, DakoCytomation, Dinamarca) durante 30 minutos à temperatura ambiente com solução de substrato cromogénico diaminobenzidina (0,6 mg/ml no

tampão salino de Tris, pH 7.6 com 12 ml de peróxido de hidrogénio a 30%). As secções foram contra coradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas segundo o procedimento *standard*.

Três patologistas especialistas em uropatologia avaliaram independentemente todas as lâminas com marcação por imunohistoquímica sem o conhecimento da avaliação dos outros patologistas (de uma forma *cega*). A mesma área em cada lâmina foi examinada usando campos aleatórios medindo 62500 μm^2 delineado por grelha graduada com 1 cm^2 anexada à ocular do microscópio. As regiões foram escolhidas dentro das áreas elevada imunorreatividade e foram observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (Jena, Alemanha).

Importa referir que, quando um teste quantitativo ou biomarcador é utilizado para fins de diagnóstico (ou de rastreio), é necessário especificar um valor de corte acima do qual (ou abaixo do qual) o resultado é considerado normal (ou atípico). O posicionamento do *ponto de corte (cutoff)* necessita de um compromisso entre a sensibilidade (probabilidade de classificar corretamente aqueles com a doença/condição) e especificidade (probabilidade de classificar corretamente aqueles sem a doença/condição). O ponto de corte ideal, no entanto, é dependente de vários critérios não só estatísticos como também clínicos e histopatológicos e frequentemente está dependente da coorte de doentes estudados.⁽²⁸⁵⁾

Para análise estatística, tendo em conta o objetivo de aplicação clínica, os biomarcadores cuja expressão resultou numa variável quantitativa do número de células que exibem “marcação” foram classificados numa de duas categorias: expressão abaixo do *cutoff* ou expressão acima do *cutoff* selecionado para cada biomarcador.

Os marcadores moleculares (biomarcadores) de expressão nuclear analisados no nosso estudo foram os seguintes:

- **Ki67** - a expressão deste biomarcador no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o MIB-1 Dako®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Foi feita a contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 14). Para efeitos de análise, consideramos dois grupos: os tumores com expressão *normal* de Ki 67 (inferior a 20% das células) e tumores com expressão *atípica* de Ki 67 (maior ou igual a 20% das células).^(13,241,248,286,287)

- **p53** – a expressão deste marcador molecular no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal *PAb1801*, Novocastra®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Foi feita a contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 14). Para efeitos de análise, consideramos duas categorias: os tumores com expressão *normal* de p53 (inferior a 20% das células) e tumores com expressão *atípica* de p53 (maior ou igual a 20% das células).^(13,241,248,286–288)
- **p21** - a expressão deste marcador molecular no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal *SX118* Dako®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Foi feita a contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 14). Para efeitos de análise, consideramos um valor de *cutoff* de 5%, resultando duas categorias: os tumores com expressão de p21 em menos de 5% das células e tumores com expressão de p21 superior a 5% das células, seguido os valores de cutoff considerados em estudos publicados sobre carcinoma urotelial da bexiga.^(13,241,248,286–288)
- **p27** - a expressão deste marcador molecular no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal *SX53G8* Dako®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Foi feita a contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 14). Para efeitos de análise, consideramos um valor de *cutoff* de 25%, resultando em duas categorias: os tumores com expressão nuclear de p27 em menos de 25% das células e tumores com expressão nuclear de p27 em mais de 25% das células, seguido os valores de cutoff considerados em estudos publicados sobre carcinoma urotelial da bexiga.^(13,241,248,286–288)
- **Ciclina D1** - a expressão de ciclina D1 no tumor no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal *DCS-6* Dako®, tendo sido seguido o

protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Foi feita a contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 14). Para efeitos de análise, utilizaremos um valor de *cutoff* de 25%. Consideramos então duas categorias: os tumores com expressão de Ciclina D1 em menos de 25% das células) e tumores com expressão de Ciclina D1 em mais de 25% das células.^(13,241,248,286–288)

- **Ciclina D3** - a expressão de ciclina D1 no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal DCS-22 Dako®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Foi feita a contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 14). Para efeitos de análise, utilizaremos um valor de cutoff de 25%, pelo que consideramos duas categorias: os tumores com expressão *normal* de Ciclina D3 (< a 25% das células) e tumores com expressão aumentada de Ciclina D3 (\geq 25% das células).^(13,241,248,286–288)

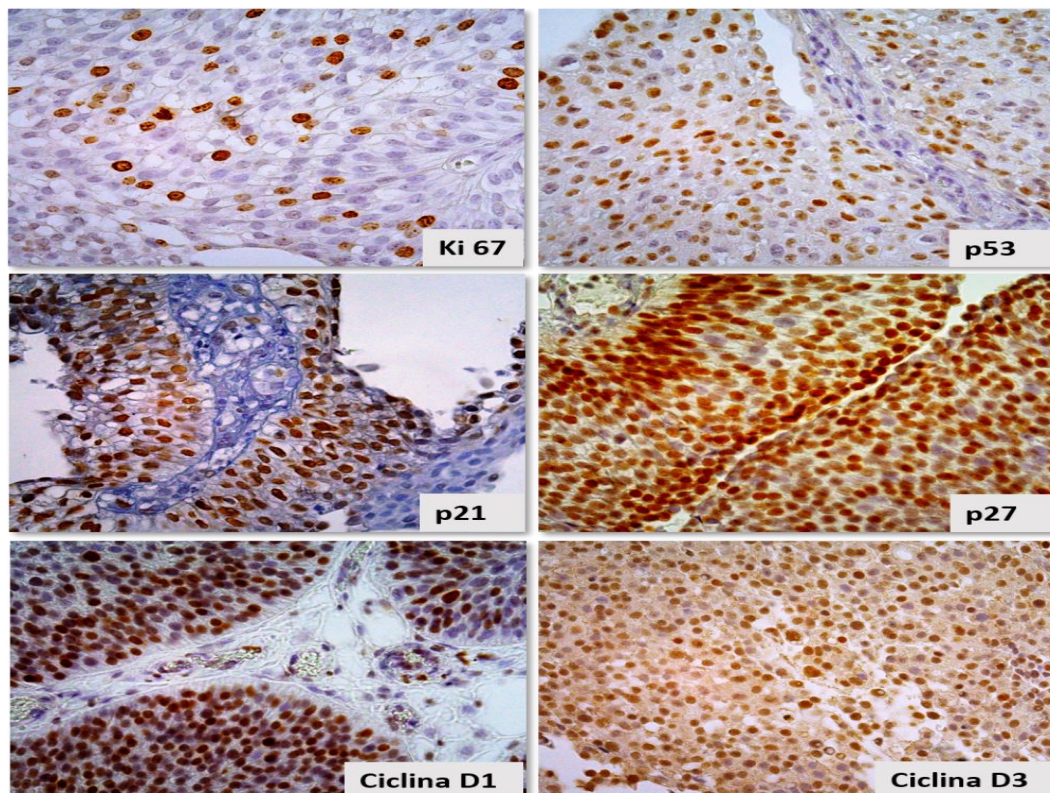


Figura 14 - Expressão dos biomarcadores com expressão nuclear

Na Tabela 6 estão resumidos os valores de *cutoff* utilizados no nosso estudo para a os biomarcadores de expressão nuclear .

Tabela 6 - Valores de *cutoff* para os biomarcadores de expressão nuclear e categorias de análise no estudo do carcinoma urotelial da bexiga

Biomarcador	Valores de <i>cutoff</i>	Categorias de expressão do biomarcador	
Ki67	20%	< 20%	≥ 20%
p53	20%	< 20%	≥ 20%
p21	5%	< 5%	≥ 5%
p27	25%	< 25%	≥ 25%
Ciclina D1	25%	< 25%	≥ 25%
Ciclina D3	25%	< 25%	≥ 25%

Para os biomarcadores com expressão citoplasmática e/ou expressão de membrana celular foi utilizada uma escala semi-quantitativa que resulta da contagem do número de células marcadas para uma contagem total de 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400). Para efeitos de análise e aplicação na prática clínica, consideram-se duas categorias: os tumores com expressão do biomarcador e tumores sem expressão do biomarcador, seguidos outros estudos para o carcinoma urotelial da bexiga. ^(251,254,289,290)

Os marcadores biomarcadores de expressão citoplasmática e/ou de membrana celular analisados no nosso estudo no estudo foram os seguintes (Tabela 7):

- **Bax** - a expressão molecular deste biomarcador no tumor foi avaliada por imunohistoquímica, com o *Bax Monoclonal Antibody (2D2)*, Invitrogen®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Os resultados apresentados numa escala semi-quantitativa [0 - sem imunorreatividade, 1 – fraca imunorreatividade (<10%), 2 – imunorreatividade ligeira (10-50%), 3 - imunorreatividade moderada (51-75%), 4 – imunorreatividade forte (≥ 75%)] resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 15). Para efeitos de análise, consideram-se duas categorias: os tumores

com expressão de Bax (score 2-4) e tumores sem expressão de Bax (score 0-1) seguido outros estudos para o CUBNMI.^(251,254,289,290)

- **Bcl-2** - a expressão de Bcl-2 nas células tumorais foi avaliada por imunohistoquímica, com o anticorpo monoclonal *bcl-2-100 clone*, Dako®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Os resultados apresentados numa escala semi-quantitativa [0 - sem imunorreatividade, 1- imunorreatividade fraca (<10%), 2 – imunorreatividade ligeira (10-50%), 3- imunorreatividade moderada (51-75%), 4 - imunorreatividade forte ($\geq 75\%$)] resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 15). Para efeitos de análise, consideramos duas categorias: os tumores com expressão de Bcl-2 (score 2-4) e tumores sem expressão de Bcl-2 (score 0-1) seguido outros trabalhos publicados no CUBNMI.^(251,254,289,290)
- **Caspase 3** - a expressão deste marcador molecular no tumor no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo *rabbit polyclonal anti-human*, Cell Signaling®, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Os resultados apresentados numa escala semi-quantitativa [0 – sem imunorreatividade, 1 – fraca imunorreatividade (<10%), 2 – imunorreatividade ligeira (10-50%), 3 - imunorreatividade moderada (51-75%), 4 – imunorreatividade forte ($\geq 75\%$)] resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células dentro das áreas de imunorreatividade mais elevada, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 15). Para efeitos de análise, consideramos duas categorias: os tumores com expressão de caspase 3 (score 2-4) e tumores sem expressão de caspase 3 (score 0-1) seguido outros estudos para o carcinoma urotelial.^(13,241,248,286,287)

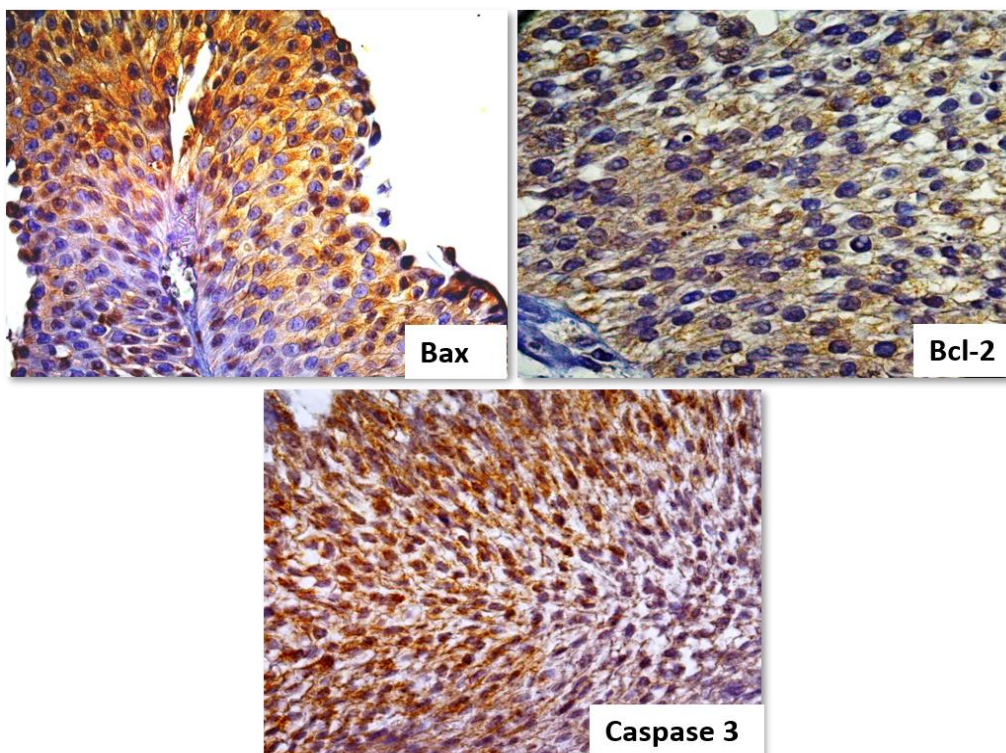


Figura 15 - Biomarcadores da apoptose com expressão citoplasmática

- CD44** - a expressão deste marcador no tumor foi avaliada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal *DF1485* *Dako*[®], tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Os resultados apresentados numa escala semi-quantitativa [0 - sem imunorreatividade, 1- imunorreatividade fraca (<10%), 2 – imunorreatividade ligeira (10-50%), 3- imunorreatividade moderada (51-75%), 4 – imunorreatividade forte ($\geq 75\%$)] resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico *Zeiss*[®] Axio Scope.A1. Para efeitos de análise, consideramos duas categorias: os tumores com expressão de CD44 (score 2-4) e tumores sem expressão de CD44 (score 0-1) seguido os valores de cutoff publicados.^(260,262)
- ErbB-2/HER2neu** - a expressão deste marcador no tumor foi avaliada com o com o anticorpo monoclonal e2-4001 *clone Lab Vision Corp*[®], tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina.

Os resultados apresentados numa escala semi-quantitativa [0 - sem imunorreatividade, 1-imunorreatividade fraca ou incompleta da membrana (<10%), 2 – imunorreatividade ligeira – coloração completa da membrana, não uniforme em intensidade (11-30%), 3- imunorreatividade forte com coloração intensa e uniforme da membrana ($\geq 30\%$)] resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1. Para efeitos de análise, consideramos duas categorias: os tumores com expressão de ErbB-2 (score 3) e tumores sem expressão de ErbB-2 (score 0-2).⁽²⁵⁶⁾

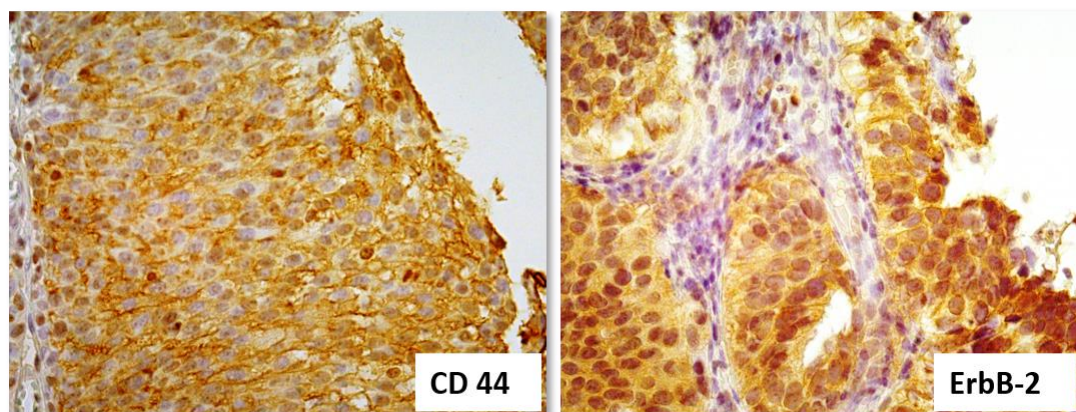


Figura 16 - Biomarcadores com expressão citoplasmática e de membrana

- **CK 5/6** - a expressão da CK 5/6 pelas células tumorais foi avaliada com o anticorpo monoclonal *D5/16B4 Cell Marque, Rocklin®*, tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Os resultados resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss® Axio Scope.A1 (figura 17). Consideramos um padrão imunohistoquímico negativo (sem expressão do biomarcador) nos casos que apresentavam células únicas distribuídas aleatoriamente (<1%) ou a presença de raras células (<1%) na camada basal das papilas. O padrão de expressão positivo para o CK5/6 (anómalo relativamente ao urotélio não neoplásico) foi caracterizado pela observação de múltiplas células imunomarcadas, exibindo alta intensidade, geralmente atingindo a espessura total das papilas. Para efeitos de análise, consideramos duas então duas categorias: os tumores com expressão anómala

CK 5/6 (padrão de positividade) e tumores sem expressão anômala de CK 5/6 (padrão de negatividade).^(268,291–293)

- **CK 20** – a expressão da CK 20 pelas células tumorais foi avaliada com o anticorpo monoclonal *Ks20.8 Dako*[®], tendo sido seguido o protocolo indicado pelo fabricante para avaliação da expressão em tecidos conservados em blocos de parafina. Os resultados apresentados resultam da contagem do número de células marcadas por 1000 células, observadas com objetiva de grande aumento (x400) usando um microscópio ótico Zeiss[®] Axio Scope.A1 (figura 17). Consideramos um padrão imunohistoquímico negativo nos casos que apresentavam células únicas distribuídas aleatoriamente (<1%), sem manchas (geralmente nas células em guarda-chuva). O padrão de expressão positivo para o CK20 (anômalo relativamente ao urotélio não neoplásico) foi caracterizado pela observação de múltiplas células imunomarcadas em níveis mais profundos das papilas (geralmente na espessura total), exibindo alta intensidade. Para efeitos de análise, consideramos duas então duas categorias: os tumores com expressão anômala CK 20 (padrão de positividade) e tumores sem expressão anômala CK 20 (padrão de negatividade).^(233,268,292,293)

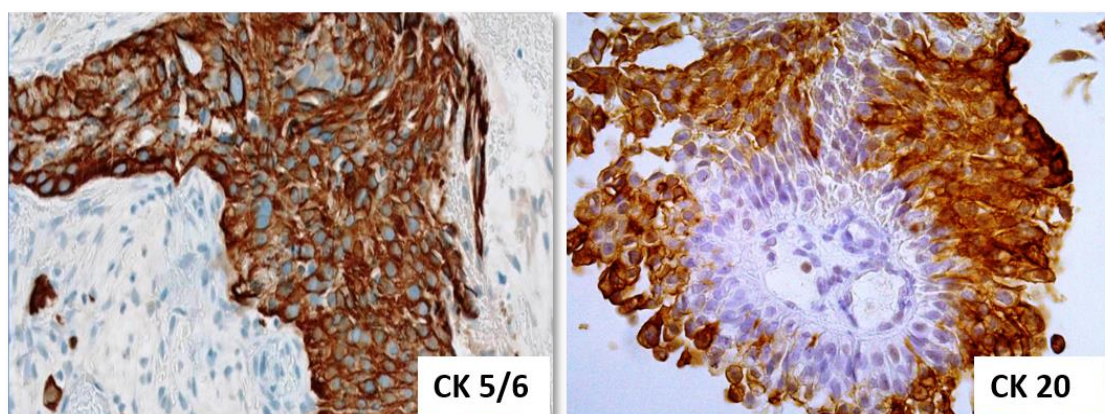


Figura 17 - Biomarcadores de expressão citoplasmática com padrão de distribuição "topográfico" anômalo (positivo)

Na tabela 7 estão resumidos os valores de *cutoff* utilizados no nosso estudo para a os biomarcadores de expressão citoplasmática e de membrana celular.

Tabela 7 - Valores de *cutoff* dos biomarcadores de expressão citoplasmática e de membrana celular no estudo do carcinoma urotelial da bexiga

Biomarcador	Sem expressão	Com expressão
Bax	< 10% (<i>score</i> 0-1)	≥ 10% (<i>score</i> 2-4)
Bcl-2	< 10% (<i>score</i> 0-1)	≥ 10% (<i>score</i> 2-4)
Caspase 3	< 10% (<i>score</i> 0-1)	≥ 10% (<i>score</i> 2-4)
CD44	< 10% (<i>score</i> 0-1)	≥ 10% (<i>score</i> 2-4)
ErbB-2	< 30%, marcação incompleta da membrana	≥ 30% com marcação completa da membrana
CK5/6	Células únicas distribuídas aleatoriamente (<1%) ou a presença de raras células na camada basal das papilas.	Coloração moderada/forte em múltiplas células <i>imunomarcadas</i> em níveis mais profundos das papilas (espessura total)
CK20	Células únicas distribuídas aleatoriamente (<1%), geralmente “células em guarda-chuva”	Múltiplas células <i>imunomarcadas</i> em níveis mais profundos das papilas (espessura total)

A variável fenótipo molecular para o CBUNMI tem por base um classificador, por nós definido, que utiliza dois dos biomarcadores anteriormente descritos e cuja expressão foi avaliada por métodos de imunohistoquímica: o CK 5/6 e o CK 20. Os CUBNMI foram classificados em quatro categoria diferenciadas pela expressão de CK 20 e/ou CK 5/6 baseada em técnicas de imunohistoquímica, definindo a variável “Fenótipo Molecular” com as categorias:

- Nulo (CK20-, CK5/6-)
- Misto (CK20+, CK5/6+)
- Basal (CK20-, CK5/6+)
- Luminal (CK20+, CK5/6-)

O quadro 3 resume os anticorpos utilizados para o estudo da expressão dos biomarcadores moleculares no CUBNMI por imunohistoquímica.

Quadro 3 - Anticorpos utilizados para o estudo da expressão dos biomarcadores no carcinoma urotelial da bexiga

Biomarcador	Clone	Laboratório comercial	Diluição
Ki-67	MIB1	Dako	1:50
p53 (TP53)	PAb1801	Novocastra, (Newcastle upon Tyne, UK)	1:40
p21 ^{Waf1}	SX118	Dako	1:25
p27 ^{kip1}	SX53G8	Dako	1:25
Ciclina D1	DCS-6	Dako	1:25
Ciclina D3	DCS-22	Dako	1:25
Bax	Clone 2D2	Invitrogen	1:100
Bcl-2	Clone bcl-2-100	Dako, Carpinteria, CA, USA	1:150
Caspase 3	Rabbit polyclonal anti-human	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	1:100
ErbB-2	e2-4001 clone	Lab Vision Corp, Fremont, CA	1:300
CD44	Clone DF1485	Dako, Denmark	1:50
CK5/6	D5/16B4 clone	Cell Marque, Rocklin, CA	1:50
CK20	Ks20.8 clone	Dako	1:400

4.4 - Variáveis dependentes

As variáveis resultado, variáveis dependentes no presente estudo são as seguintes:

- **Recorrência** (*sinónimo de recidiva*) tumoral já anteriormente definida como o diagnóstico de um *novo* tumor vesical, confirmado por análise anatomopatológica, não diferindo em estágio “T” ou grau histológico do tumor anteriormente tratado, com um período mínimo de três meses livre de doença, controlado por cistoscopia e citologia. A variável “recorrência” assim definida é uma variável categórica (se ocorrer ou não ocorrer o evento definido).

- **Progressão** da doença ocorre perante a existência de uma recorrência tumoral na bexiga cuja análise anatopatológica revele a presença de infiltração da muscular própria ou o aumento do grau histológico do tumor. Também se considera progressão se são diagnosticadas adenopatias “*de novo*” (extensão ganglionar da doença) ou a presença de metástases noutros órgãos, com confirmação histológica de tumor urotelial. A variável “progressão” assim definida é uma variável categórica (se ocorrer ou não ocorrer o evento definido).
- **Morte específica** causada pela doença ocorre pela progressão da neoplasia urotelial inicialmente diagnosticada. São excluídas desta definição todas as outras causas de morte. A variável “morte específica” assim definida é uma variável categórica (se ocorrer ou não ocorrer o evento definido).
- **Tempo até à recorrência** medido em meses completos desde o diagnóstico histológico inicial até à ocorrência do evento definido como recorrência tumoral. A variável assim definida é uma variável numérica contínua.
- **Tempo até à progressão** medido em meses completos desde o diagnóstico histológico inicial até à ocorrência do evento definido como progressão tumoral. A variável assim definida é uma variável numérica contínua.
- **Tempo até à morte específica** medido em meses completos desde o diagnóstico histológico inicial até à ocorrência do evento definido como morte específica. A variável assim definida é uma variável numérica contínua.

4.5 - Análise estatística

As técnicas estatísticas indicadas para este estudo acompanham o padrão de análise de um estudo epidemiológico de coorte retrospectivo.^(282,294,295)

Foi feita análise descritiva das variáveis clínicas e anatomopatológicas recorrendo a tabelas de frequência para as variáveis categóricas e medidas de localização e dispersão para as variáveis numéricas.

Foi efetuada análise de sobrevivência de Kaplan Meier com teste Log Rank para relacionar os fatores de prognóstico com o tempo até à recorrência tumoral, progressão tumoral e morte específica.⁽²⁷⁷⁾ Nesta análise de sobrevivência os fatores de prognóstico numéricos foram incluídos na análise com os dados agrupados em categorias.

Para estimar o risco relativo de ocorrência de recorrência, de progressão ou de morte específica *Hazard Ratio* (HR), assim como, para ensaiar um modelo de prognóstico para a recorrência, progressão e morte específica foi usada a análise de regressão múltipla de Cox. Este método de regressão (regressão de Cox – *Proportional Hazards Model*) permite determinar o efeito de um determinado fator na sobrevivência (recorrência, progressão ou morte específica), ajustado para o eventual confundimento de outros fatores envolvidos no modelo. O termo *fator de confundimento* define um fator que pode estar associado simultaneamente ao resultado (sobrevivência à recorrência), assim como, ao fator de exposição.^(277,282,296)

Para validação do modelo de Cox (funções hazard proporcionais), utilizou-se o teste da razão de verossimilhanças conjuntamente com a avaliação do paralelismo das curvas logarítmicas $\text{Ln}(-\text{Ln})$ da sobrevivência.^(282,297)

Para relacionar os fatores de prognóstico categóricos com as variáveis categóricas binárias de resultado (variáveis indicadoras de recorrência, progressão ou morte específica) recorreremos a tabelas de cruzamento e ao teste do Qui quadrado (ou exato de Fisher).⁽²⁸²⁾

Na metodologia de seleção de variáveis a incluir na análise multivariável, começamos por efetuar análises bivariável entre cada fator de prognóstico e cada uma das variáveis de resultado (recorrência, progressão e morte específica). Todas as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram incluídas no modelo multivariável [incluímos também variáveis com um valor p próximo do significado estatístico ($p < 0,10$)]. Com este modelo multivariável identificamos os fatores de prognóstico estatisticamente significativos após ajustamento para outros fatores, considerados os fatores de prognóstico estatisticamente mais importantes.⁽²⁸²⁾

Para extrair os fatores de prognóstico com maior importância, utilizou-se na análise de regressão de Cox o método “*Backward*”, eliminando-se sempre a variável com o maior valor de p. A seleção dos fatores de prognóstico estatisticamente significativos, através da análise multivariável, permitiu-nos determinar as taxas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para a presença de uma dada categoria de um fator de prognóstico face ao à variável resultado (binária) expectável.^(282,295)

Todas as análises foram efetuadas com o programa estatístico IBM® SPSS®, versão 24 para Windows®, utilizando o nível de significância de 5% nos testes de hipóteses bilaterais e os intervalos de confiança a 95% nas estimativas globais da taxa de

recorrência, progressão e morte específica. Também se determinaram os intervalos de confiança a 95% para as medidas de associação e efeito HR.

As diferentes fases da análise dos dados estão representadas na figura 18.

Dos 165 doentes que inicialmente foram selecionados para o estudo com o diagnóstico de CIBNMI, 147 cumpriam os critérios de inclusão: doentes com o diagnóstico inicial de carcinoma urotelial da bexiga Ta e T1 (os doentes com CIS concomitante foram excluídos), sem antecedentes de tumor do urotélio (na bexiga ou no urotélio alto). Na análise univariável, para os fatores de prognóstico, a dimensão amostra foi de 147 doentes. Na análise bivariável, os fatores de prognóstico incluíram 147 doentes bem com as variável resultado. Na análise multivariável, foram igualmente incluídos os 147 doentes.

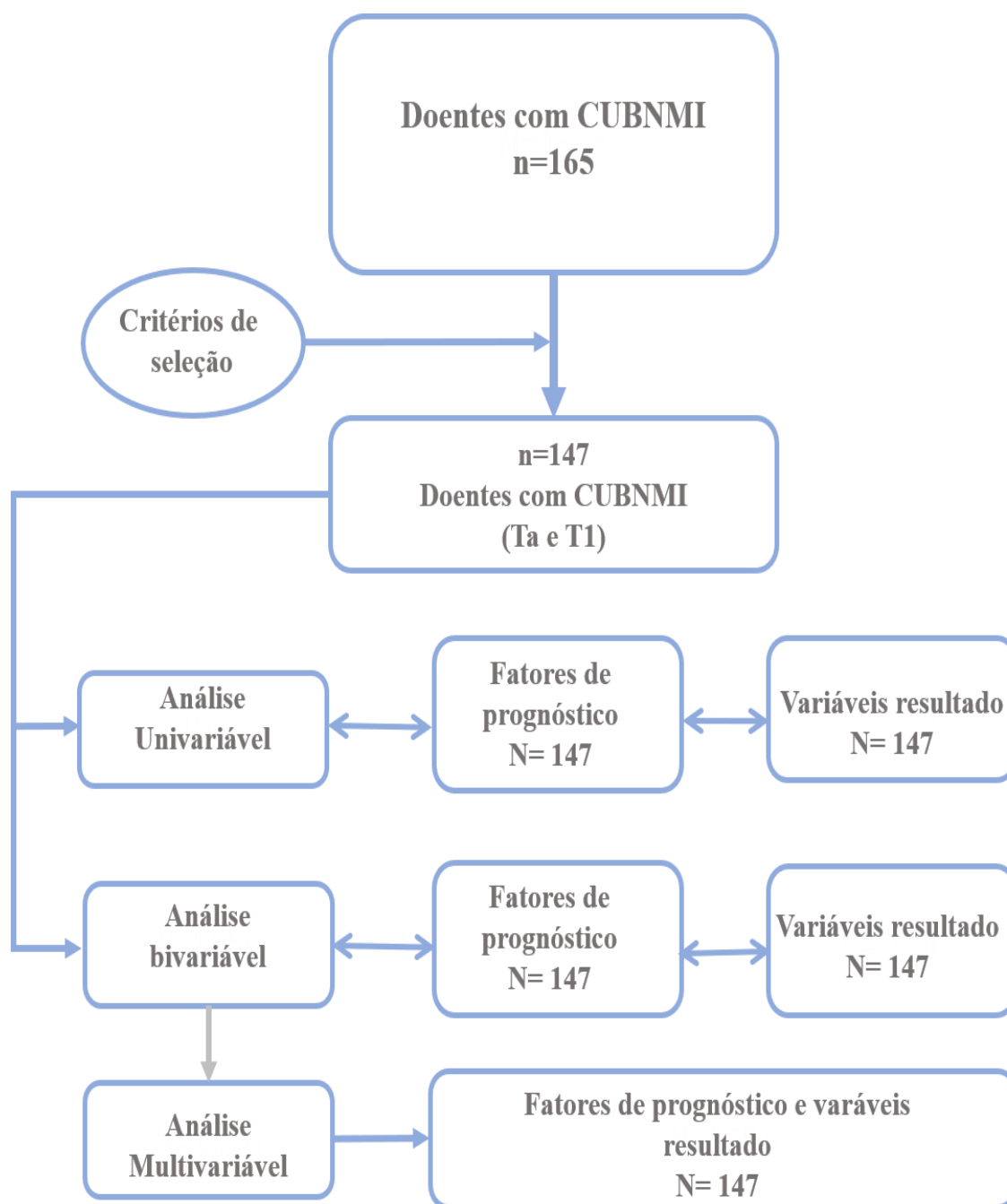


Figura 18 – Representação esquemática das diferentes fases de análise dos dados.

4.6 - Plano de operacionalização das Variáveis

Neste capítulo procedemos à identificação e sistematização das variáveis em estudo. A identificação das variáveis a serem operacionalizadas neste estudo compreende a descrição dos fatores de prognóstico (variáveis independentes) seguida das variáveis de resultado.

As variáveis independentes clínico-patológicas são apresentadas no quadro 4, referindo os parâmetros e tipo de variável em análise.

Quadro 4 - Variáveis independentes clínico-patológicas

VARIÁVEL	Valores da variável	Tipo de variável
IDADE	Em anos completos	Numérica
IDADE_70	0 - < 70 anos 1 - ≥ 70 anos	Categórica nominal
SEXO	0 - Masculino 1 - Feminino	Categórica nominal
D_TUM Dimensão do tumor	Em centímetros (cm)	Numérica
D_TUM3 Tumor ≥ 3 cm	0 - < 3 cm 1 - ≥ 3 cm	Categórica nominal
ESTADIO Estádio T	0 - Ta 1 - T1	Categórica nominal
GRAU Grau Histológico	0 - Baixo grau 1 - Alto grau	Categórica nominal

No quadro 5 apresentam-se as variáveis independentes - biomarcadores, referindo igualmente os parâmetros e tipo de variável em análise.

Quadro 5 - Variáveis independentes – biomarcadores (continua)

VARIÁVEL	Valores da variável	Tipo de variável
Ki67	Percentagem de células do tumor que exibem o biomarcador	Numérica
C_Ki67	0 - < 20% 1 - ≥ 20%	Categórica nominal
p53	Percentagem de células do tumor que exibem o biomarcador	Numérica
C_P53	0 - < 20% 1 - ≥ 20%	Categórica nominal

Quadro 5 - Variáveis independentes – biomarcadores (continuação)

VARIÁVEL	Valores da variável	Tipo de variável
p21	Percentagem de células do tumor que exibem o biomarcador	Numérica
C_P21	0 - < 5% 1 - ≥ 5%	Categórica nominal
p27	Percentagem de células do tumor que exibem o biomarcador	Numérica
C_P27	0 - < 25% 1 - ≥ 25%	Categórica nominal
CYCLIN_D1 Ciclina D1	Percentagem de células do tumor que exibem o biomarcador	Numérica
C_CYCLIN_D1	0 - < 25% 1 - ≥ 25%	Categórica nominal
CYCLIN_D3 Ciclina D3	Percentagem de células do tumor que exibem o biomarcador	Numérica
C_CYCLIN_D3	0 - < 25% 1 - ≥ 25%	Categórica nominal
Bax	0 – Sem expressão de biomarcador 1 – Com expressão de biomarcador	Categórica nominal
Bcl_2	0 – sem expressão de biomarcador 1 – com expressão de biomarcador	Categórica nominal
C_CASP Caspases	0 – Sem expressão de biomarcador 1 – Com expressão de biomarcador	Categórica nominal
CD44	0 – sem expressão de biomarcador 1 – com expressão de biomarcador	Categórica nominal
C_ERB2	0 – sem expressão de biomarcador 1 – com expressão de biomarcador	Categórica nominal
CK5/6	0 – sem expressão de biomarcador 1 – com expressão de biomarcador	Categórica nominal
CK20	0 – sem expressão de biomarcador 1 – com expressão de biomarcador	Categórica nominal
Fenótipo Molecular	0 – Nulo 1 – Misto 2 – Basal 3 - Luminal	Categórica nominal

No quadro 6 apresentam-se as variáveis dependentes (variáveis de resultado), referindo igualmente os parâmetros e tipo de variável em análise.

Quadro 6 - Variáveis dependentes

VARIÁVEL	Valores da variável	Tipo de variável
REC Recorrência	0 – Não 1 – Sim	Categórica nominal
T_1REC Tempo até 1ª recorrência	Em meses	Numérica
PROG Progressão	0 – Não 1 – Sim	Categórica nominal
T_PROG Tempo até progressão	Em meses	Numérica
M_ESP Morte específica da doença	0 – Não 1 – Sim	Categórica nominal
T_MESP Tempo até morte específica	Em meses	Numérica

4.7 - Questões Éticas

O objetivo a atingir neste projeto segue o princípio ético fundamental da beneficência, na obtenção de evidência científica que seja útil na prevenção da doença e promoção da saúde do ser humano, particularmente na área da oncologia. Como tal, os avanços científicos e potenciais benefícios obtidos deste projeto serão disponibilizados à comunidade científica através de publicações e comunicações científicas.

No desenho deste projeto foram implementadas todas as medidas consideradas necessárias para garantir o respeito da dignidade e direitos humanos. As amostras biológicas estão codificadas e os dados obtidos estão guardados de forma confidencial no Serviço de Anatomia Patológica apenas acessíveis a pessoal devidamente sujeito ao sigilo profissional.

As amostras foram colhidas após o consentimento livre e esclarecido dos sujeitos analisados, de acordo com o princípio ético da autonomia, consagrado em todos os normativos éticos para investigação no ser humano [Conselho da Europa (1997), Comité de Bioética do Conselho da Europa (2002; 2006), UNESCO (2002; 2004), Associação Médica Mundial (2004), Associação das Organizações Médicas (2003) e Council for International Organizations of Medical Sciences (2002; 2005) e legais (Lei Portuguesa n.º12/2005)].

Toda a investigação foi efetuada de forma transparente, por pessoal devidamente qualificado e de acordo com as regras de conduta profissionais estabelecidas para garantir a honestidade, integridade e responsabilidade profissional.

O estudo foi submetido ao Conselho de Ética da Fundação Champalimaud cujo parecer foi favorável à realização do estudo de acordo com os princípios enunciados e cujo resultado se encontra em anexo. Foi igualmente submetido à Comissão Nacional de Proteção de Dados.

Não foram identificadas situações de conflitos de interesse na equipa de investigação.

5. Resultados



5. Resultados

5.1 - Caracterização sócio demográfica dos doentes

A amostra que serviu de base ao estudo de coorte clínico retrospectivo é constituída por 147 doentes com o diagnóstico de CUB sem invasão da muscular própria (Ta e T1). Para produzir resultados relevantes em oncologia, atendendo à história natural da doença, são necessários tempos de seguimento dos doentes que se prolongam por vários anos. Assim, neste estudo, a mediana do tempo de observação dos doentes contado desde o diagnóstico histológico foi de 76 meses. Salientamos que o tempo médio de observação foi de 73,4 meses (desvio padrão de 28,5 meses) e a amplitude dos tempos de observação foi algo extensa com um mínimo de 6 meses e um máximo de 120 meses.

Iniciaremos a caracterização dos doentes admitidos para o estudo através das variáveis sociodemográficas sexo e idade.

Na tabela 8 apresentamos os resultados das variáveis sociodemográficas sexo e idade.

Estes resultados evidenciam uma elevada percentagem de doentes do sexo masculino (88,4%). A média de idades era de 66,9 anos. A amplitude de variação etária compreende um mínimo de 31 anos e um máximo de 89 anos. Cerca de 44% tinham mais de 70 anos.

Tabela 8 - Caracterização sociodemográfica (n = 147)

Variável sociodemográfica	Categorias da variável	Frequências absolutas (contagens)	Frequências relativas (percentagens)	Estatísticas descritivas da variável
Sexo (género)	0 - Masculino	130	88,4 %	
	1 - Feminino	17	11,6 %	
Idade (em anos)	0 - < 70 anos	83	56,4 %	Média: 66,9 anos
	1 - ≥ 70 anos	64	43,6 %	Mediana: 68 anos Desvio padrão: 10,8 Min.-Máx.: 31 – 89 anos

5.2 - Variáveis anatomopatológicas na “baseline”

A caracterização das variáveis anatomopatológicas é feita na altura do tratamento cirúrgico do tumor vesical (RTU-V) após o diagnóstico histopatológico.

Na análise descritiva da variável “diâmetro tumoral”, consideramos o diâmetro do maior tumor no caso de haver múltiplos implantes. A média era de 3.27 centímetros, variando entre um mínimo de 1 centímetro e um máximo de 8 centímetros. Em cerca de 65% dos casos a dimensão do tumor era igual ou superior a 3 centímetros (tabela 9).

Na caracterização do estágio **T**, segundo a classificação da AJCC/TNM (American Joint Committee of Cancer/Tumor-Node-Metastasis), revisão de 2016, o predomínio foi dos tumores sem invasão da lâmina própria (Ta). Só cerca de 25% dos tumores encontravam-se no estágio T1 como apresentado na tabela 9.

Relativamente ao grau histológico dos tumores, de acordo com a classificação da OMS 2004/2016, o diagnóstico histológico em cerca de dois terços dos doentes foi o tumor de baixo grau (64,6%). Em cerca de 35% dos casos, o diagnóstico histológico foi de tumor de alto grau (tabela 9).

Tabela 9 - Variáveis anatomopatológicas (n=147)

Variável anatomopatológica	Categorias da variável	Frequências absolutas (contagens)	Frequências relativas (percentagens)	Estatísticas descritivas da variável
Diâmetro tumoral (em centímetros)	0 - < 3 cm	51	34,7 %	Média: 3,27 cm Mediana: 3 cm Desvio padrão: 1,56 Min.- Máx.: 1 – 8 cm
	1 - ≥ 3 cm	96	65,3 %	
Estádio T (AJCC/TNM, 2016)	0 - Ta	110	74,8 %	
	1 - T1	37	25,2 %	
Grau histológico (OMS, 2004/2016)	0 – Baixo grau	95	64,6 %	
	1 – Alto grau	52	35,4 %	

Quando consideramos os tumores no estágio Ta, cerca de 86% são tumores de baixo grau. Todos os tumores no estágio T1 são tumores de alto grau, representando cerca de 71% do total de tumores de alto grau nos doentes em estudo.

Na tabela 10 encontra representada a combinação do estágio **T** (AJCC/TNM, 2016) com o grau histológico (OMS 2004/2016).

Tabela 10 - Estádio e Grau do Tumor (n=147)

			Grau		
			Baixo Grau	Alto Grau	Total
Estádio	Ta	Contagem	95	15	110
		% em Estádio	86,4%	13,6%	100%
		% em Grau	100%	28,8%	74,8%
	T1	Contagem	0	37	37
		% em Estádio	0.0%	100%	100%
		% em Grau	0.0%	71,2%	25,2%
Total		Contagem	95	52	147
		% em Estádio	64,6%	35,4%	100%
		% em Grau	100%	100%	100%

5.3 - Expressão dos biomarcadores

Na caracterização dos resultados obtidos da expressão dos biomarcadores com expressão quantitativa, isto é, cujos resultados são expressos em percentagem de células com imunomarcagem nuclear.

A utilização dum valor de *cutoff* “diferente” para cada um dos biomarcadores (com base em critérios do metabolismo celular e da sua expressão no urotélio “normal”) permite a análise das variáveis quantitativas como variáveis categóricas.

A expressão de Ki-67, um marcador de proliferação celular, está aumentada ($\geq 20\%$) em 15% dos casos. Uma relação semelhante é encontrada para o p53, com uma expressão aumentada ($\geq 20\%$) em 16% dos casos.

A expressão da ciclina D1 está aumentada ($\geq 25\%$) em 10% dos casos. Um padrão semelhante se verifica para a ciclina D3, expressão aumentada em 6% dos casos.

A expressão de p21 sugere um padrão diferente com expressão aumentada ($\geq 5\%$) em cerca de 68% dos casos. O p27 apresenta uma expressão aumentada ($\geq 25\%$) em cerca de 50% dos casos.

Na tabela 11 estão resumidos os resultados da expressão quantitativa da marcação nuclear dos biomarcadores do ciclo celular.

Tabela 11 - Expressão nuclear dos biomarcadores do ciclo celular (n=147)

Variável (cutoff)	Categorias da variável	Frequências absolutas (contagens)	Frequências relativas (percentagens)	Estatísticas descritivas da variável contínua
Ki67 (20%)	0 - < 20% 1 - ≥ 20%	125 22	85,0 % 15,0 %	Média: 7,95 Mediana: 3,67 Desvio padrão: 11 Min.-Máx.: 0 - 50,6
p53 (20%)	0 - < 20% 1 - ≥ 20%	123 24	83,7 % 16,3 %	Média: 10,3 Mediana: 3,55 Desvio padrão: 18,8 Min.-Máx.: 0 – 92,0
p21 ^{Waf1} (5%)	0 - < 5% 1 - ≥ 5%	47 100	32,0 % 68,0 %	Média: 16,2 Mediana: 12,0 Desvio padrão: 17,2 Min.-Máx.: 0 – 78,9
p27 ^{Kip1} (25%)	0 - < 25% 1 - ≥ 25%	68 79	46,3 % 53,7 %	Média: 29,8 Mediana: 28,0 Desvio padrão: 22,3 Min.-Máx.: 0 – 92,5
Ciclina D1 (25%)	0 - < 25% 1 - ≥ 25%	132 15	90,0 % 10,0 %	Média: 11,1 Mediana: 7,0 Desvio padrão: 12,4 Min.-Máx.: 0 – 77,8
Ciclina D3 (25%)	0 - < 25% 1 - ≥ 25%	138 9	93,9 % 6,1 %	Média: 9,25 Mediana: 5,55 Desvio padrão: 15,3 Min.-Máx.: 0 – 90,0

Na tabela 12 apresentam-se os resultados da expressão dos biomarcadores e citoplasmáticos e da membrana celular. A imunomarcção das células é expressa primariamente numa escala semi-quantitativa quem contempla também o resultado de padrões de imunomarcção, resultando finalmente numa variável binária “com expressão” ou “sem expressão”.

Considerando os biomarcadores reguladores da apoptose, observamos que cerca de 60% dos tumores analisados não expressam Bax, numa percentagem complementar 40% não têm expressão de Bcl-2 e a caspase 3 tem expressão em cerca de 50% dos

casos. Verificamos uma elevada percentagem dos tumores, cerca de 70%, expressam o ErbB-2.

Tabela 12 – Expressão citoplasmática/membranar dos biomarcadores (n=147)

Variável “biomarcador”	Categorias da variável	Frequências absolutas (contagens)	Frequências relativas (percentagens)
Bax	0 – Sem expressão	89	60,5 %
	1 – Com expressão	58	39,5 %
Bcl-2	0 – Sem expressão	60	40,8 %
	1 – Com expressão	87	59,2 %
Caspase-3	0 – Sem expressão	71	48,3 %
	1 – Com expressão	76	51,7 %
ErbB-2	0 – Sem expressão	43	29,3 %
	1 – Com expressão	104	70,7 %
CD44	0 – Sem expressão	107	72,8 %
	1 – Com expressão	40	27,7 %
CK 5/6	0 – Sem expressão	121	82,3 %
	1 – Com expressão	26	17,7 %
CK 20	0 – Sem expressão	109	74,1 %
	1 – Com expressão	38	25,9 %
Fenótipo Molecular	0 – Nulo	89	60,5 %
	1 – Misto	6	4,1 %
	2 – Basal	20	13,6 %
	3 – Luminal	32	21,8 %

Dos biomarcadores relacionados com a diferenciação celular, o CD44 só é expresso por cerca de um quarto dos tumores analisados, a CK5/6 tem expressão em cerca de 18% dos tumores e CK20 é expressa em 26% dos tumores analisados.

Em relação ao fenótipo molecular, uma variável que resulta da expressão combinada da CK 5/6 e CK20, cerca de 60% dos tumores exibem o fenótipo nulo, 4% exibem o fenótipo misto, 13,6% exibem o fenótipo basal e 22% exibem o fenótipo luminal.

5.4 - Análises descritiva das variáveis dependentes

De seguida analisamos as variáveis dependentes: recorrência, progressão e morte específica pela doença.

5.4.1 - Recorrência Tumoral

A recorrência tumoral que foi definida como o diagnóstico de um novo tumor vesical, confirmado por análise anatomopatológica, não diferindo em “T” ou grau histológico do tumor anteriormente tratado, num doente com um período mínimo de três meses livre de doença, controlado por cistoscopia e citologia.

Na tabela 13 apresentam-se os resultados da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para a recorrência da doença.

Tabela 13 - Análise de Kaplan-Meier para a recorrência tumoral

Tempo (meses)	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
6	144	0,986	0,014
12	120	0,826	0,174
18	100	0,717	0,283
24	86	0,624	0,376
30	76	0,551	0,449
36	74	0,544	0,456
42	72	0,529	0,471
48	69	0,522	0,478
54	68	0,514	0,486
60	63	0,507	0,493
66	47	0,482	0,518
72	40	0,482	0,518
78	30	0,482	0,518
84	29	0,482	0,518
90	20	0,482	0,518
96	15	0,482	0,518
102	15	0,482	0,518
108	10	0,482	0,518
114	4	0,482	0,518
120	0	0,482	0,518

Estes resultados mostram-nos que a recorrência tumoral, avaliada pela análise de Kaplan-Meier, tem uma proporção de incidência cumulativa de 50%. Após os 66 meses não se registaram casos de recorrência da doença.

O tempo de sobrevivência mediano à recorrência foi de 61,0 meses.

Na figura 19 está representada a curva de sobrevivência à recorrência tumoral.

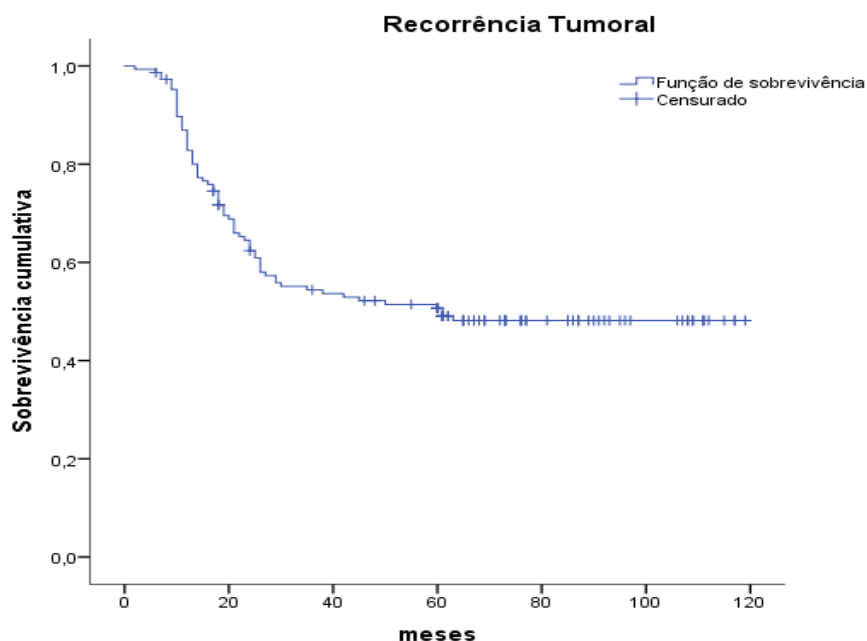


Figura 19 - Curva de sobrevivência dos doentes face à recorrência da doença

5.4.2 - Progressão tumoral

A progressão da doença foi definida como a existência de uma recorrência tumoral na bexiga cuja análise anatopatológica revele a presença de infiltração da muscular própria ($>T1$) ou o aumento do grau histológico do tumor. Também se considera progressão se são diagnosticadas adenopatias “*de novo*” (extensão ganglionar da doença) ou a presença de metástases noutros órgãos, com confirmação histológica de tumor urotelial.

No nosso estudo, a proporção de incidência cumulativa de progressão foi de cerca de 20%. Nos casos em que registamos progressão da doença, esta ocorreu sempre antes dos 60 meses (tabela 14).

Como se pode observar na Figura 20, a curva de sobrevivência à progressão apresenta uma descida pouco acentuada, nunca ultrapassando os 50%, assim, não se define tempo mediano de sobrevivência.

Tabela 14 - Análise de Kaplan-Meier para a Progressão da doença

Tempo (meses)	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
6	146	1,000	0,000
12	141	0,972	0,028
18	136	0,966	0,034
24	130	0,937	0,063
30	127	0,923	0,077
36	119	0,872	0,128
42	113	0,850	0,150
48	108	0,834	0,166
54	105	0,819	0,181
60	99	0,803	0,197
66	85	0,803	0,197
72	73	0,803	0,197
78	60	0,803	0,197
84	55	0,803	0,197
90	42	0,803	0,197
96	29	0,803	0,197
102	26	0,803	0,197
108	19	0,803	0,197
114	7	0,803	0,197
120	0	0,803	0,197

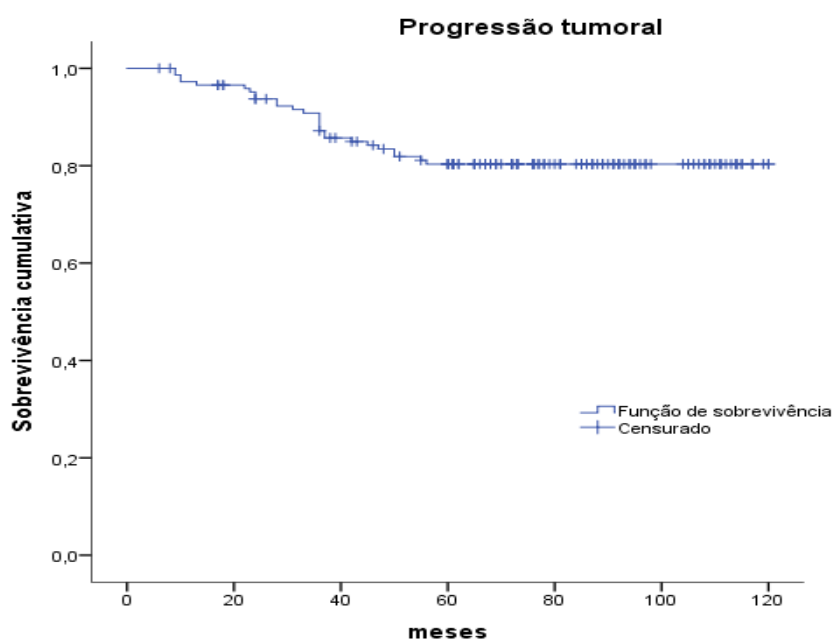


Figura 20 - Curva de sobrevivência dos doentes face à progressão da doença

5.4.3 - Morte específica da doença

No nosso estudo, através da análise de Kaplan-Meier, a taxa de incidência cumulativa de morte específica aos 120 meses foi de cerca de 16 %.

Tabela 15 - Análise de Kaplan-Meier para a morte específica pela doença

Tempo (meses)	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
6	146	1,000	0,000
12	145	1,000	0,000
18	137	0,972	0,028
24	133	0,965	0,035
30	132	0,958	0,042
36	128	0,943	0,057
42	125	0,943	0,057
48	117	0,905	0,085
54	114	0,890	0,110
60	109	0,882	0,118
66	93	0,865	0,135
72	79	0,855	0,145
78	66	0,855	0,145
84	60	0,842	0,158
90	44	0,842	0,158
96	31	0,842	0,158
102	28	0,842	0,158
108	21	0,842	0,158
114	7	0,842	0,158
120	0	0,842	0,158

Como se pode observar na figura 21, a curva de incidência cumulativa da morte específica pela doença objetiva uma descida pouco acentuada, não atingindo os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

Após os 84 meses não se registaram óbitos tendo como causa a doença neoplásica da bexiga.

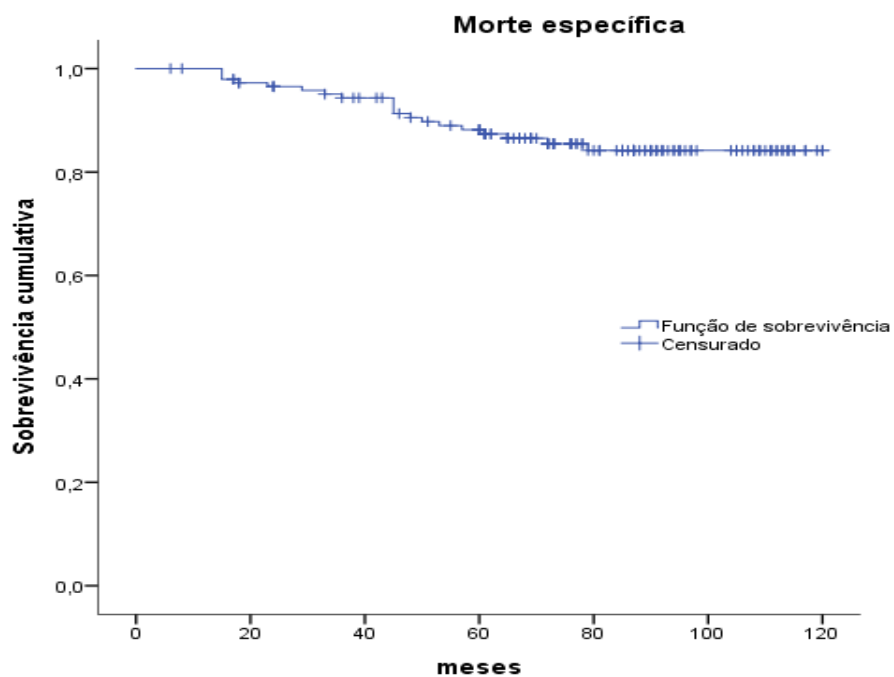


Figura 21 - Curva de sobrevivência dos doentes face à morte específica da doença

Atendendo ao facto de que a morte específica pela doença ocorre por progressão da doença, verificamos que durante o período de observação (120 meses), em 80% dos doentes em que ocorreu a progressão da doença, esta acabou por causar a morte.

5.5 - Análise dos fatores de prognóstico nos resultados da recorrência tumoral

Neste capítulo apresentamos os resultados da análise das variáveis prognóstico face ao tempo até à recorrência tumoral. Utilizaremos a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e a análise de regressão de Cox para determinar o *hazard ratio* relativamente ao grupo comparador. Consideraremos também o tempo mediano de sobrevivência à recorrência como um fator discriminativo. As taxas de incidência ou sobrevivência cumulativas comentadas são aos 120 meses.

Iniciaremos a nossa análise pelas variáveis sociodemográficas seguidas das variáveis histopatológicas e finalmente pelos biomarcadores moleculares.

No final do capítulo apresentamos o resumo dos resultados relevantes com a indicação das variáveis que se revelaram estatisticamente significativas para $p < 0,05$ e as variáveis que serão integradas no modelo de análise de regressão de Cox multivariável.

5.5.1 - Análise dos fatores de prognóstico sociodemográficos nos resultados da recorrência tumoral

5.5.1.1- Idade

Considerando os dois subgrupos de análise: doentes com idade inferior a 70 anos e doentes com idade igual ou superior a 70 anos na altura do diagnóstico. O resultado da análise de Kaplan-Meier da influência da idade no tempo até à recorrência (tabela 16 e figura 22), não mostra diferenças estatisticamente significativas ($p=0.694$) entre os grupos comparativos.

No entanto, apesar de não ser estatisticamente significativa, observa-se uma diferença no tempo mediano de sobrevivência à recorrência para as duas categorias consideradas, com um tempo mediano de sobrevivência à recorrência de 45 meses para o grupo de doentes com idade inferior a 70 anos e de 61 meses para os doentes com idade ≥ 70 anos, parecendo inclusive observar-se, em termos descritivos, um efeito protetor da idade face à recorrência.

Tabela 16 - Análise de Kaplan-Meier da idade face à recorrência

Tempo (meses)	Idade < 70 anos (n=83)*			Idade ≥ 70 anos (n=64)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	67	0,807	0,193	53	0,855	0,145
24	50	0,602	0,498	36	0,658	0,342
36	43	0,530	0,470	31	0,566	0,434
48	40	0,493	0,507	29	0,566	0,434
60	36	0,480	0,520	27	0,547	0,453
72	18	0,467	0,533	22	0,505	0,495
84	12	0,467	0,533	17	0,505	0,495
96	6	0,467	0,533	9	0,505	0,495
108	5	0,467	0,533	5	0,505	0,495
120	0	0,467	0,533	0	0,505	0,495
Tempo de sobrevivência mediano	45 meses			61 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,694		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,911		
IC (95%)**				(0,570; 1,456)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

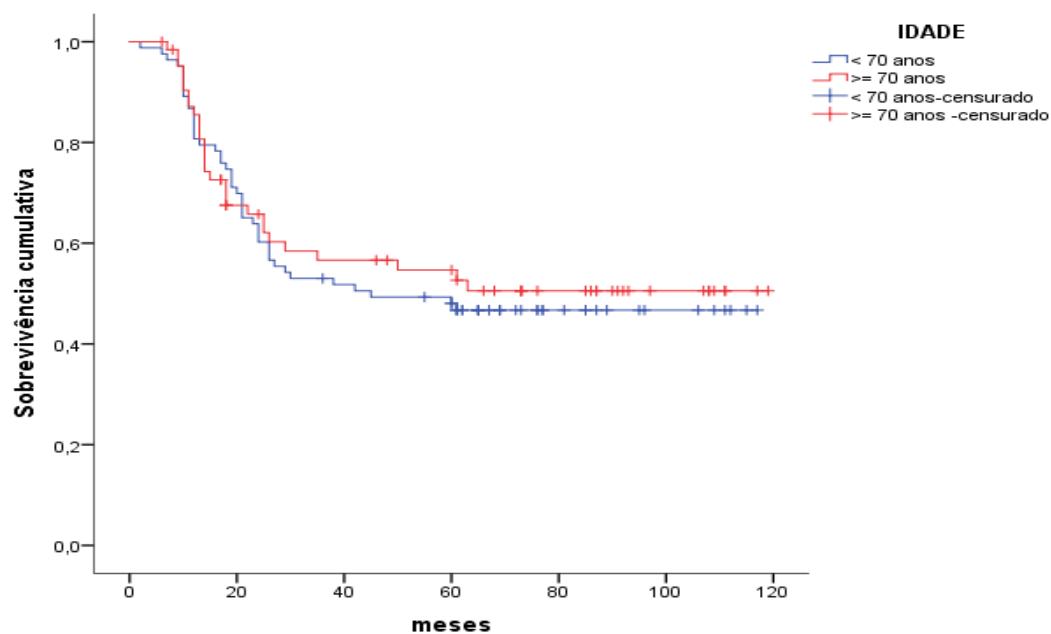


Figura 22 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com idade < 70 anos *versus* doentes com idade ≥ 70 anos face à recorrência

5.5.1.2 - Sexo

Na tabela 17 apresentamos os resultados da análise de sobrevivência (Kaplan-Meier) para os dois gêneros. Da análise de Kaplan Meier da influência do sexo no tempo até à recorrência não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,424$).

Os resultados descritivos sugerem que a recorrência tumoral é maior nas mulheres (proporção de incidência cumulativa de 65% nas mulheres). Não se verificaram diferenças nos tempos medianos de sobrevivência à recorrência que foi de 61 meses para ambos os sexos.

Apesar destes resultados não atingirem significado estatístico para $p<0,05$, o sentido das diferenças é relevante do ponto de vista epidemiológico. Embora o CUB seja menos frequente nas mulheres (no nosso estudo represente cerca de 11,5% dos doentes), a proporção de incidência cumulativa de recorrência observada foi maior nas mulheres (65% *versus* 51% nos homens) (tabela 17 e figura 23).

Tabela 17 - Análise de Kaplan-Meier do sexo face à recorrência

Tempo (meses)	Masculino (n=130)*			Feminino (n=17)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	109	0,838	0,162	11	0,733	0,267
24	78	0,627	0,373	8	0,600	0,400
36	67	0,547	0,453	7	0,525	0,475
48	67	0,522	0,478	7	0,525	0,475
60	57	0,505	0,495	6	0,525	0,475
72	36	0,496	0,514	4	0,350	0,650
84	27	0,496	0,514	2	0,350	0,650
96	15	0,496	0,514	0	0,350	0,650
108	10	0,496	0,514	0	0,350	0,650
120	0	0,496	0,514	0	0,350	0,650
Tempo de sobrevivência mediano	61 meses			61 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,424		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,324		
IC (95%)**				(0,659; 2,661)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

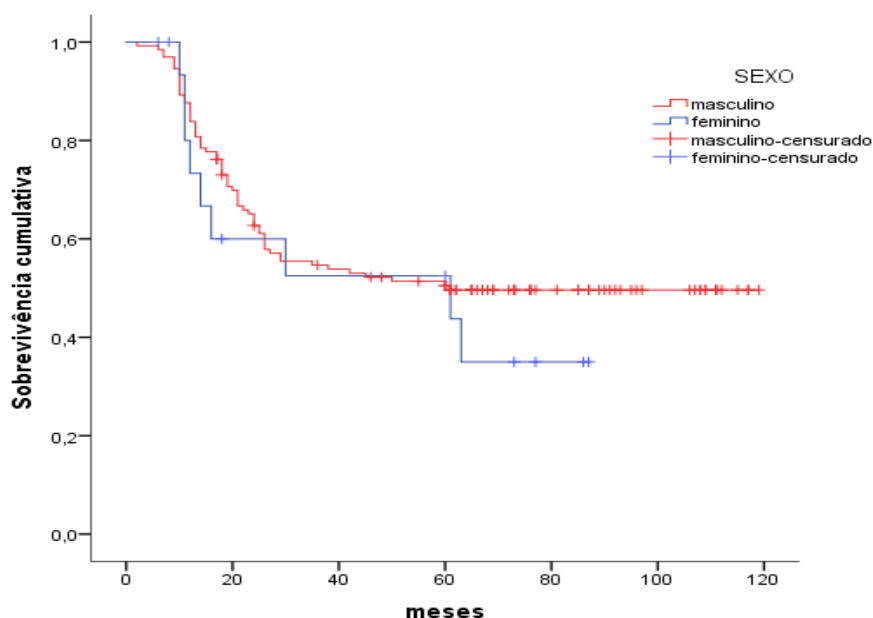


Figura 23 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do sexo masculino *versus* doentes do sexo feminino face à recorrência

5.5.2 - Análise dos fatores de prognóstico clínico-patológicos nos resultados da recorrência tumoral

5.5.2.1 - Diâmetro tumoral

Consideramos duas categorias na análise: doentes com tumor inferior a 3 centímetros e doentes com tumor maior ou igual a 3 centímetros. Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da dimensão do tumor vesical observado no tempo até à recorrência (tabela 18), encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos. A categoria de doentes nos quais se verificou uma dimensão do tumor ≥ 3 cm apresenta inferior sobrevivência com uma proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença de 60% enquanto o subgrupo de doentes com tumor < 3 cm apresenta uma taxa de incidência cumulativa de 40% [$p=0,034$, *hazard ratio* de 1,72, IC 95% (1,031; 2,994)].

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 26 meses para os doentes com tumor vesical ≥ 3 cm. Para o subgrupo de doente com tumor < 3 cm, a proporção de incidência cumulativa de recorrência não atinge os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

Tabela 18 - Análise de Kaplan-Meier do diâmetro tumoral face à recorrência

Tempo (meses)	Tumor < 3 cm (n=51)*			Tumor ≥ 3 cm (n=96)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	43	0,843	0,157	77	0,819	0,181
24	38	0,745	0,255	48	0,556	0,444
36	33	0,667	0,333	41	0,475	0,525
48	32	0,667	0,333	37	0,440	0,560
60	28	0,624	0,576	35	0,440	0,560
72	17	0,602	0,398	23	0,413	0,587
84	12	0,602	0,398	17	0,413	0,587
96	5	0,602	0,398	10	0,413	0,587
108	5	0,602	0,398	7	0,413	0,587
120	0	0,602	0,398	0	0,413	0,587
Tempo de sobrevivência mediano	-----			26 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,034		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,727		
IC (95%)**				(1,031; 2,994)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 24 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

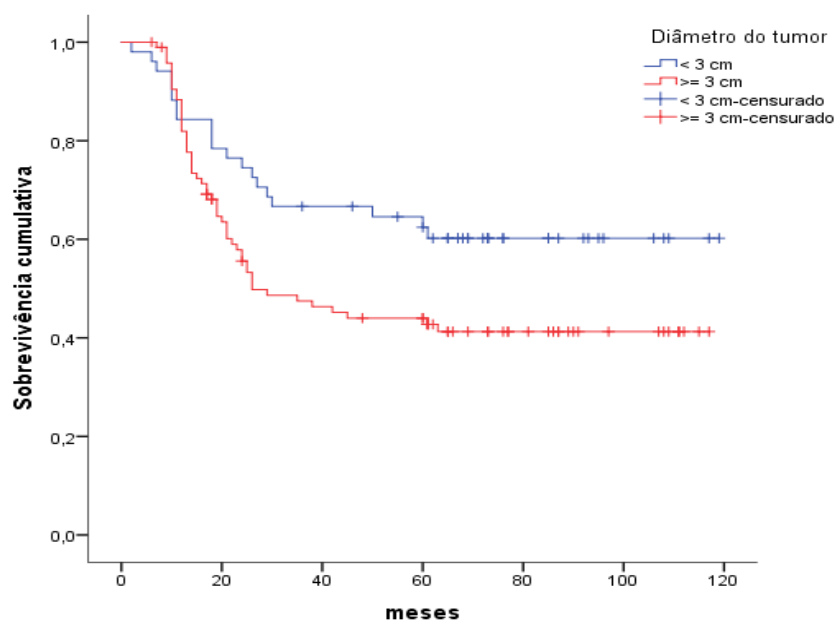


Figura 24 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes de face à recorrência considerando a dimensão tumoral

5.4.2.2 - Estádio

Em relação ao estágio, as categorias consideradas são: doentes com Ta e os doentes com T1 que se analisam em relação à recorrência tumoral.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do estágio (Ta, T1), observado no tempo até à recorrência (tabela 19), o resultado evidencia diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos. Os doentes com T1 apresentam proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença de 68% enquanto os doentes com Ta apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 47% [$p=0,006$, *hazard ratio* de 1,94, IC 95% (1,189; 3,165)].

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 21 meses para os doentes com tumor no estágio T1. Para os doentes com Ta, a proporção de incidência cumulativa de recorrência não atinge os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

Tabela 19 -Análise de Kaplan-Meier do Estádio face à recorrência

Tempo (meses)	Ta (n=110)*			T1 (n=37)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	95	0,872	0,128	25	0,696	0,504
24	70	0,675	0,525	16	0,466	0,534
36	61	0,598	0,412	13	0,379	0,621
48	57	0,579	0,421	12	0,350	0,650
60	51	0,558	0,442	12	0,350	0,650
72	32	0,535	0,465	8	0,321	0,679
84	24	0,535	0,465	5	0,321	0,679
96	13	0,535	0,465	2	0,321	0,679
108	10	0,535	0,465	0	0,321	0,679
120	0	0,535	0,465	0	0,321	0,679
Tempo de sobrevivência mediano	-----			21 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,006		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,940		
IC (95%)**				(1,189; 3,165)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 25 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

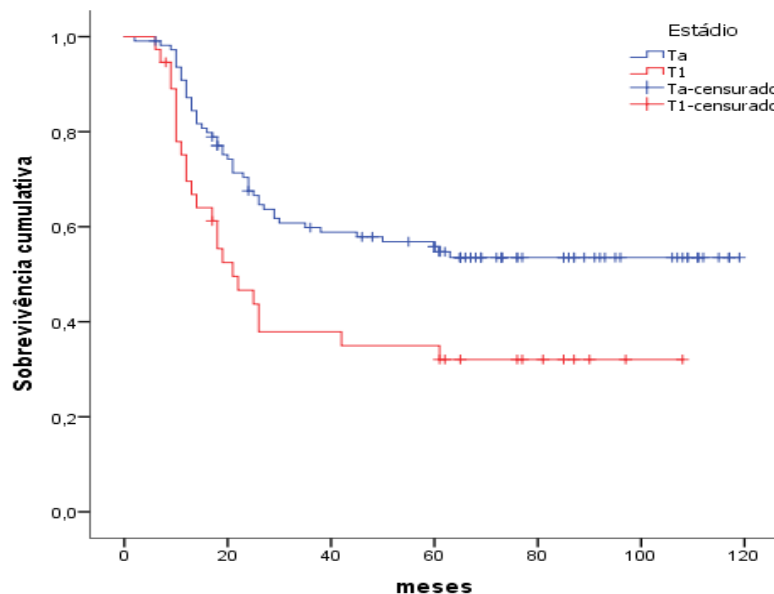


Figura 25 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com estágio Ta *versus* T1 face à recorrência

5.5.2.3 - Grau do Tumor

Consideramos duas categorias para análise relativamente ao grau do tumor: tumor de baixo grau e tumor de alto grau.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do grau histológico observada no tempo até à recorrência (tabela 20), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Os doentes com tumor de alto grau apresentam uma proporção de incidência cumulativa de recorrência de 71% enquanto os doentes com tumor de baixo grau apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 42% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 2,38, IC 95% (1,502; 3,777)].

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 22 meses para os doentes com tumor de alto grau. Para os doentes com tumor de baixo grau, a incidência cumulativa de recorrência não atinge os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

Tabela 20 - Análise de Kaplan-Meier do grau histológico relativamente à recorrência

Tempo (meses)	Baixo Grau (n=95)*			Alto Grau (n=52)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	86	0,915	0,085	34	0,667	0,333
24	63	0,699	0,301	23	0,485	0,515
36	57	0,644	0,356	17	0,359	0,641
48	53	0,621	0,379	17	0,337	0,663
60	48	0,609	0,391	15	0,316	0,684
72	30	0,583	0,417	10	0,295	0,705
84	22	0,583	0,417	7	0,295	0,705
96	13	0,583	0,417	1	0,295	0,705
108	10	0,583	0,417	0	0,295	0,705
120	0	0,583	0,417	0	0,295	0,705
Tempo de sobrevivência mediano	-----			22 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				< 0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				2,382		
IC (95%)**				(1,502; 3,777)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 26 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

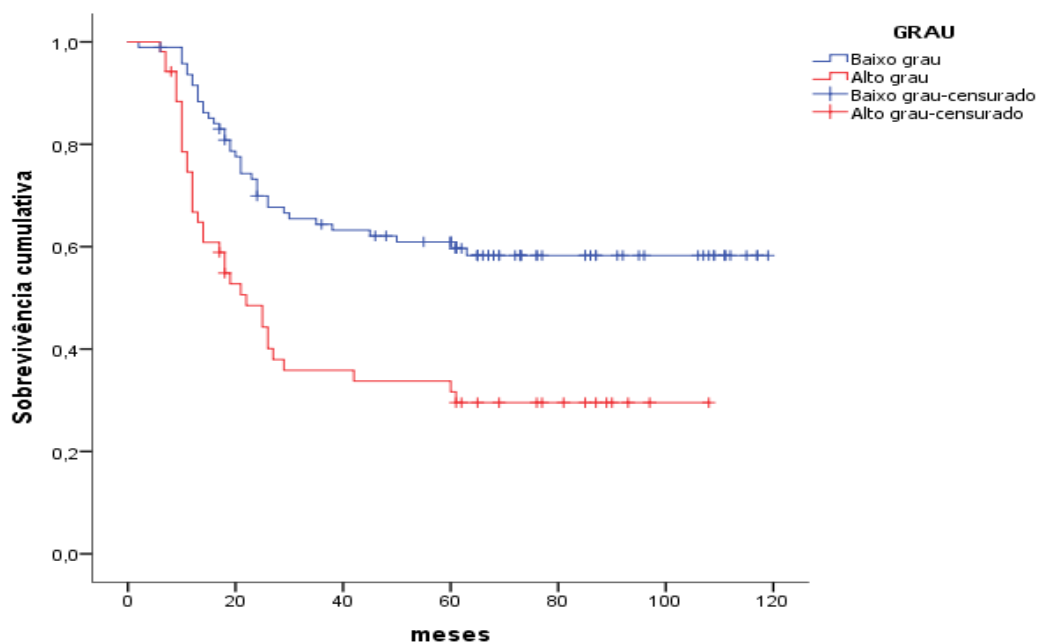


Figura 26 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com tumores de alto grau versus doentes com tumor de baixo grau histológico relativamente à recorrência

5.5.3 - Análise da expressão dos biomarcadores moleculares nos resultados da recorrência tumoral

5.5.3.1 - Ki-67

Analisa-se a expressão do Ki-67, tendo em conta as duas categorias consideradas, utilizando o valor de *cutoff* de 20%, verificamos que cerca de 85% dos doentes apresentam uma expressão do biomarcador < 20%.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão de Ki-67 observada no tempo até à recorrência (tabela 21, figura 27), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Os doentes com expressão de Ki-67 $\geq 20\%$ (n= 22) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença de 65% enquanto os doentes com expressão de Ki-67 < 20% (n= 125) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 49,5% [p=0,03, *hazard ratio* de 1,88, IC 95% (1,047; 3,367)].

Tabela 21 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ki-67 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	Ki-67 Expressão < 20% (n=125)*			Ki-67 Expressão ≥ 20% (n= 22)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	107	0,870	0,130	13	0,591	0,409
24	78	0,663	0,337	8	0,404	0,594
36	66	0,570	0,430	8	0,404	0,594
48	62	0,553	0,447	7	0,354	0,646
60	56	0,535	0,465	7	0,354	0,646
72	36	0,505	0,495	4	0,354	0,646
84	26	0,505	0,495	4	0,354	0,646
96	14	0,505	0,495	1	0,354	0,646
108	10	0,505	0,495	0	0,354	0,646
120	0	0,505	0,495	0	0,354	0,646
Tempo de sobrevivência mediano	-----			18 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,030		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,877		
IC (95%)**				(1,047; 3,367)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 18 meses para os doentes com expressão de Ki-67 $\geq 20\%$. Para os doentes com tumor cuja expressão de Ki-67 $< 20\%$ (n= 125) não existe tempo mediano de sobrevivência uma vez que a proporção de sobrevivência cumulativa à recorrência foi de 51%.

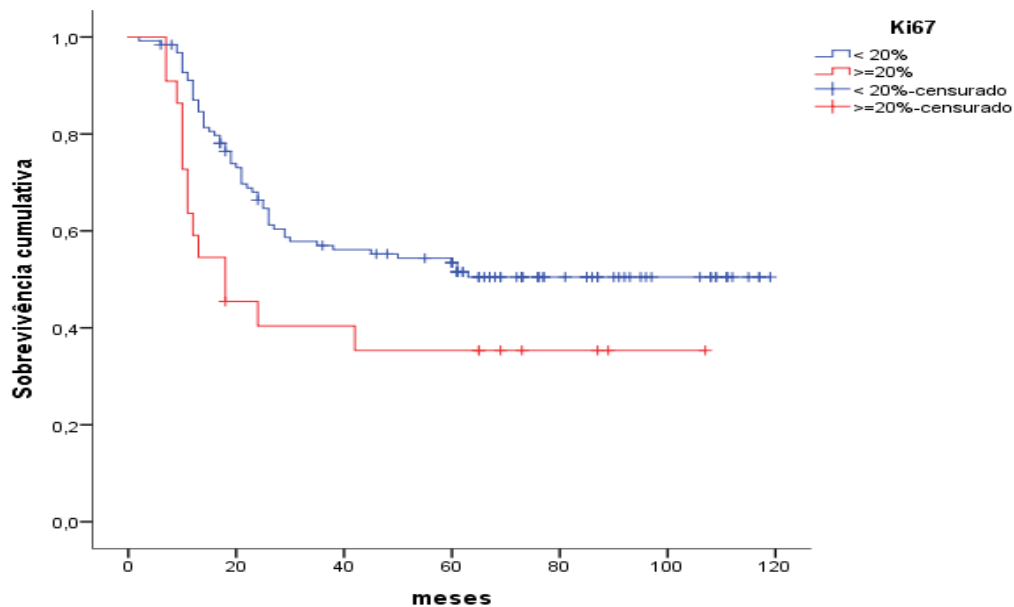


Figura 27 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de Ki-67

5.5.3.2 - p53

Analisa-se a expressão de p53 considerando as duas categorias resultantes da aplicação do *cutoff* de 20%: os doentes com tumores com expressão de p53 $< 20\%$ e os doentes cujas células tumorais expressam o p53 acima dos 20%.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão de p53 no tempo até à recorrência (tabela 22 e figura 28), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,470$) entre os grupos comparativos.

No entanto, em termos descritivos, refira-se que o tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo com expressão de p53 $\geq 20\%$ (n= 24) foi de 42 meses e de 63 meses para o grupo com expressão p53 $< 20\%$ (n=123).

Tabela 22 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p53 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	p53 Expressão < 20% (n=123)*			p53 Expressão ≥ 20% (n= 24)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	101	0,835	0,165	19	0,792	0,218
24	73	0,640	0,360	13	0,542	0,458
36	61	0,544	0,456	13	0,542	0,458
48	57	0,526	0,474	12	0,500	0,500
60	62	0,517	0,493	11	0,458	0,542
72	32	0,496	0,514	8	0,417	0,583
84	23	0,496	0,514	6	0,417	0,583
96	12	0,496	0,514	3	0,417	0,583
108	8	0,496	0,514	2	0,417	0,583
120	0	0,496	0,514	0	0,417	0,583
Tempo de sobrevivência mediano	63 meses			42 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,470		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,237		
IC (95%)**				(0,690; 2,215)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

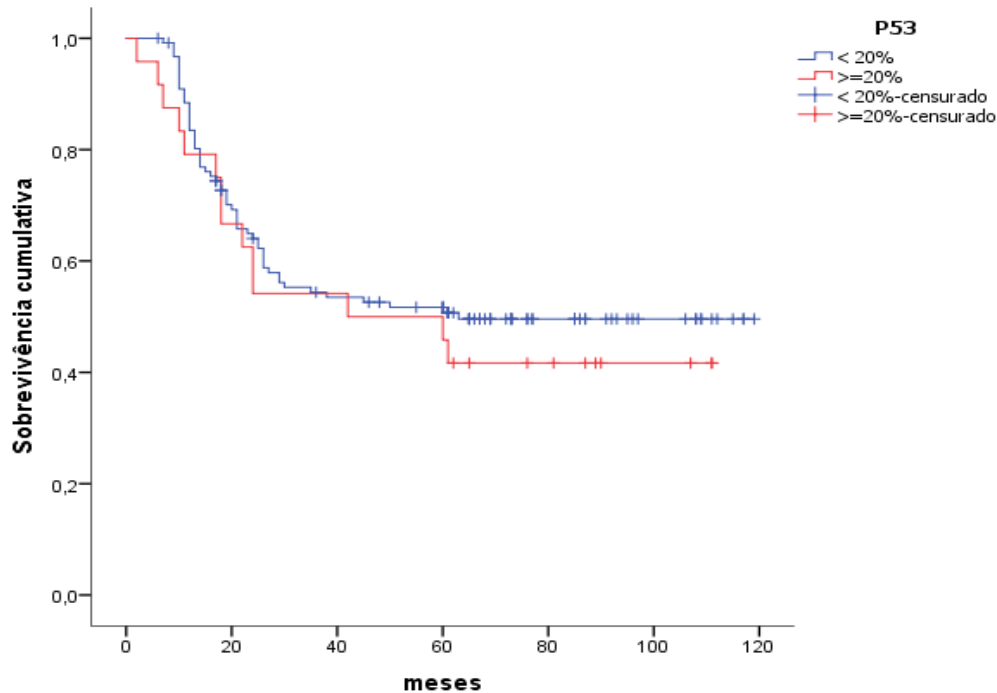


Figura 28 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de p53

5.5.3.3 - p21

A expressão de p21 nas células tumorais leva-nos a considerar dois grupos de análise utilizando o valor de *cutoff* de 5% referido na literatura: os doentes com tumores com expressão de p21 < 5% e os doentes cujas células tumorais expressam o p21 acima dos 5%.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão do p21 no tempo até à recorrência (tabela 23), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,927$) entre os grupos comparativos.

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo com expressão de p21 $\geq 5\%$ ($n= 100$) foi de 61 meses. Para o grupo com expressão p21 < 5% ($n=47$) o tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 50 meses.

Tabela 23 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p21 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	p21 Expressão < 5% (n=47)*			p21 Expressão ≥ 5% (n= 100)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	39	0,849	0,151	81	0,818	0,182
24	31	0,717	0,283	55	0,580	0,420
36	22	0,532	0,468	52	0,549	0,451
48	19	0,508	0,492	50	0,528	0,572
60	17	0.481	0,519	46	0,517	0,483
72	11	0.481	0,519	29	0,482	0,518
84	7	0.481	0,519	22	0,482	0,518
96	3	0.481	0,519	12	0,482	0,518
108	2	0.481	0,519	8	0,482	0,518
120	0	0.481	0,519	0	0,482	0,518
Tempo de sobrevivência mediano	50 meses			61 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,921		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,025		
IC (95%)**				(0,625; 1,681)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência à recorrência nas duas categorias considerada relativamente à expressão de p21 (figura 29) evidencia uma quase sobreposição das curvas.

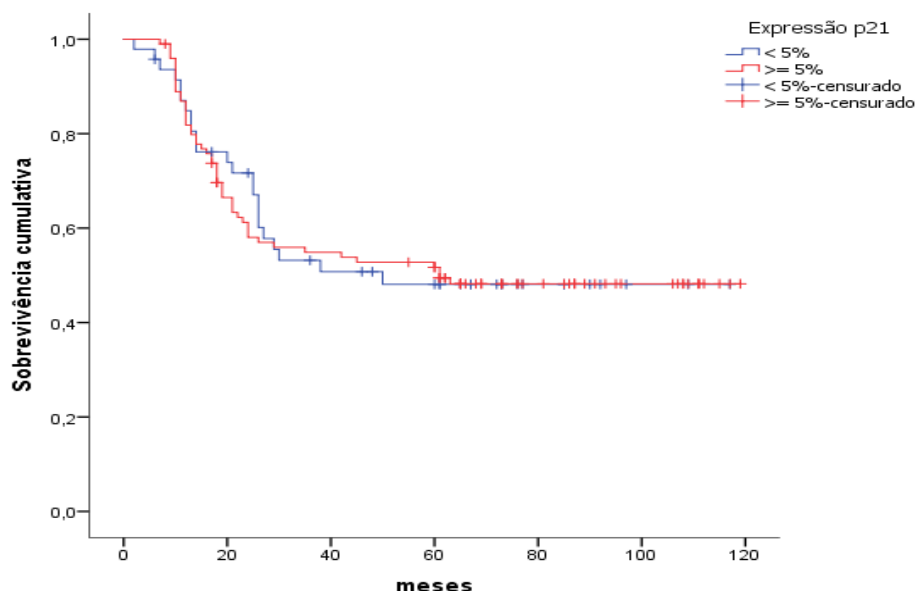


Figura 29 - Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de p21

5.5.3.4 - p27

Analisa-se o p27 considerando dois grupos relativamente à expressão do biomarcador nas células tumorais utilizando o valor de *cutoff* referido na literatura (25%): os doentes com tumores com expressão de p27 < 25% e os doentes cujas células tumorais expressam o p27 acima dos 25%.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão do p27 no tempo até à recorrência (tabela 24), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,883$) entre os grupos comparativos.

Observamos, no entanto, em termos descritivos, diferença no tempo mediano de sobrevivência à recorrência. Para o grupo com expressão de p27 $\geq 25\%$ ($n=79$) foi de 61 meses, enquanto para o grupo com expressão p27 < 25% ($n=68$) o tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 50 meses.

A observação das curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de p27 (figura 30) evidencia uma quase sobreposição das curvas nas duas categorias consideradas.

Tabela 24 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p27 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	p27 Expressão < 25% (n=68)*			p27 Expressão ≥ 25% (n= 79)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	54	0,806	0,194	66	0,846	0,154
24	40	0,612	0,388	46	0,634	0,366
36	33	0,520	0,480	41	0,565	0,435
48	31	0,505	0,495	38	0,537	0,463
60	27	0,488	0,512	36	0,523	0,477
72	23	0,488	0,512	23	0,478	0,522
84	18	0,488	0,512	22	0,478	0,522
96	7	0,488	0,512	12	0,478	0,522
108	6	0,488	0,512	8	0,478	0,522
120	0	0,488	0,512	0	0,478	0,522
Tempo de sobrevivência a mediano	50 meses			61 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,883		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,966		
IC (95%)**				(0,610; 1,531)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

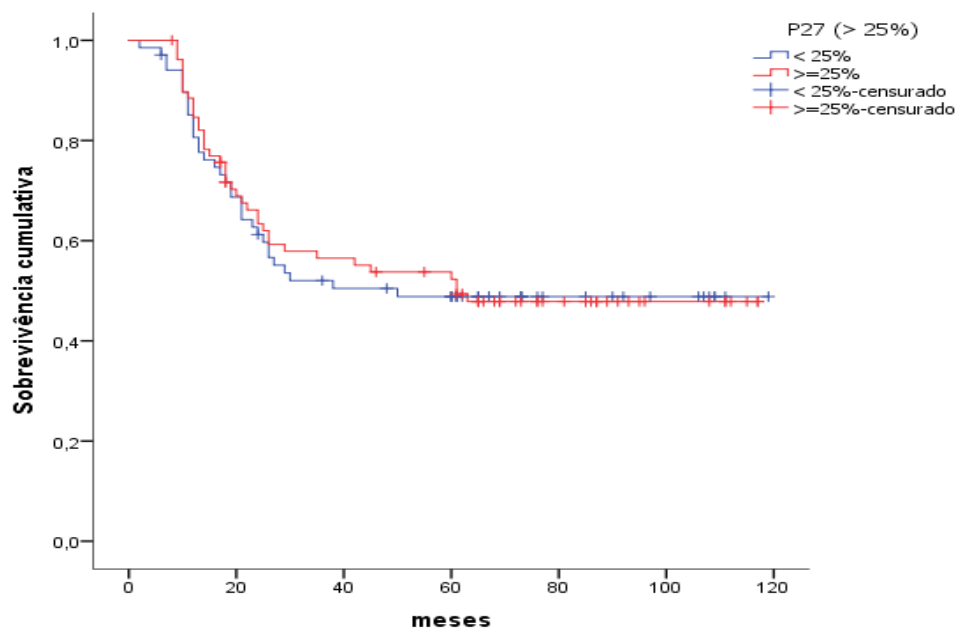


Figura 30 - Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de p27

5.5.3.5 - Ciclina D1

Consideramos dois grupos de análise na expressão da ciclina D1 nas células tumorais utilizando o valor de *cutoff* de 25%: os doentes com tumores com expressão de ciclina D1 < 25% e os doentes cujas células tumorais expressam a ciclina D1 acima dos 25%.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão da ciclina D1 observada no tempo até à recorrência (tabela 25 e figura 31), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Assim, o grupo de doentes com expressão da ciclina D1 ≥ 25% (n= 15) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença de 80% enquanto no grupo em que a expressão de ciclina D1 < 25% (n=132) a proporção de incidência cumulativa de recorrência é de 48,5% [p=0,008, *hazard ratio* de 2,24, IC 95% (1,202; 4,172)].

Estes resultados sugerem que uma expressão da ciclina D1 ≥ 25% pelas células tumorais é um fator de risco para a recorrência do CUBNMI, com uma magnitude de 2,2 vezes.

Tabela 25 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D1 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	Ciclina D1 Expressão < 25% (n=132)*			Ciclina D1 Expressão ≥ 25% (n= 15)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	109	0,839	0,161	11	0,733	0,267
24	80	0,650	0,350	6	0,400	0,600
36	70	0,577	0,423	3	0,267	0,733
48	66	0,560	0,440	4	0,200	0,800
60	60	0.543	0,457	3	0,200	0,800
72	37	0.515	0.485	3	0,200	0,800
84	27	0.515	0.485	3	0,200	0,800
96	14	0.515	0.485	1	0,200	0,800
108	9	0.515	0.485	1	0,200	0,800
120	0	0.515	0.485	0	0,200	0,800
Tempo de sobrevivência mediano	-----			18 meses		
Valor de p (Log Rank)				0,008		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				2,240		
IC (95%)**				(1,202; 4,172)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para os doentes com expressão da ciclina D1 $\geq 25\%$ foi de 18 meses. A curva de sobrevivência cumulativa à recorrência para o grupo com expressão da ciclina D1 $< 25\%$ apresenta uma descida lenta que não atinge os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

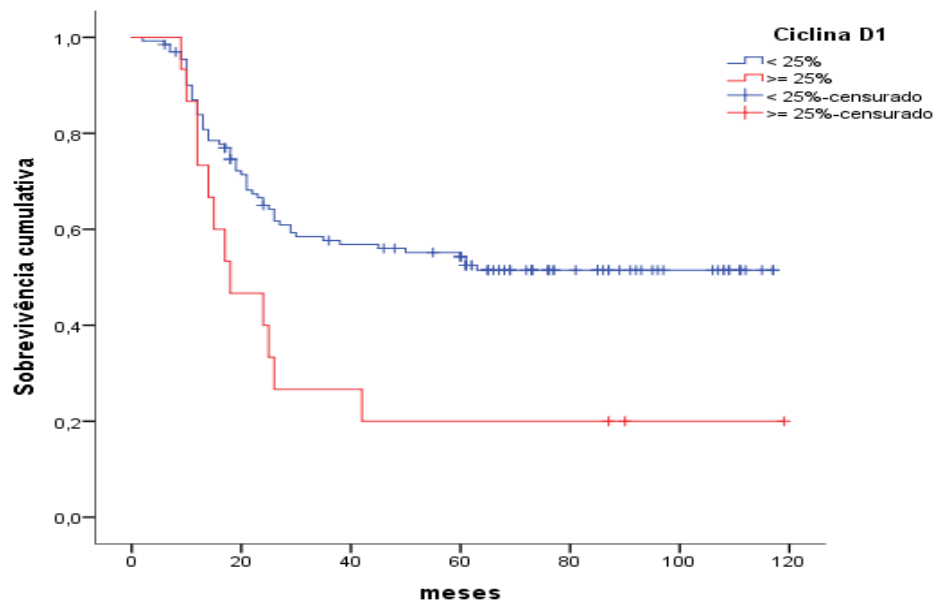


Figura 31 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão da ciclina D1

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 24 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

5.5.3.6 - Ciclina D3

Na análise da expressão da ciclina D3 consideramos dois grupos utilizando o valor de *cutoff* de 25%: os doentes com tumores com expressão de ciclina D3 $< 25\%$ e os doentes cujas células tumorais com expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão da ciclina D3 no tempo até à recorrência (tabela 26 e figura 32) concluímos que não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,229$).

Tabela 26 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D3 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	Ciclina D3 Expressão < 25% (n=138)*			Ciclina D3 Expressão ≥ 25% (n= 9)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	115	0,846	0,154	5	0,556	0,444
24	83	0,637	0,363	3	0,417	0,583
36	71	0,552	0,448	3	0,417	0,583
48	66	0,529	0,471	3	0,417	0,583
60	60	0,513	0,487	3	0,417	0,583
72	35	0,486	0,514	2	0,417	0,583
84	28	0,486	0,514	1	0,417	0,583
96	14	0,486	0,514	1	0,417	0,583
108	9	0,486	0,514	1	0,417	0,583
120	0	0,486	0,514	0	0,417	0,583
Tempo de sobrevivência mediano	61 meses			21 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,299		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,603		
IC (95%)**				(0,646; 3,679)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 21 meses para os doentes com expressão da ciclina D3 ≥ 25% (n=9) e de 61 meses para o grupo de doentes com expressão da ciclina D3 < 25%.

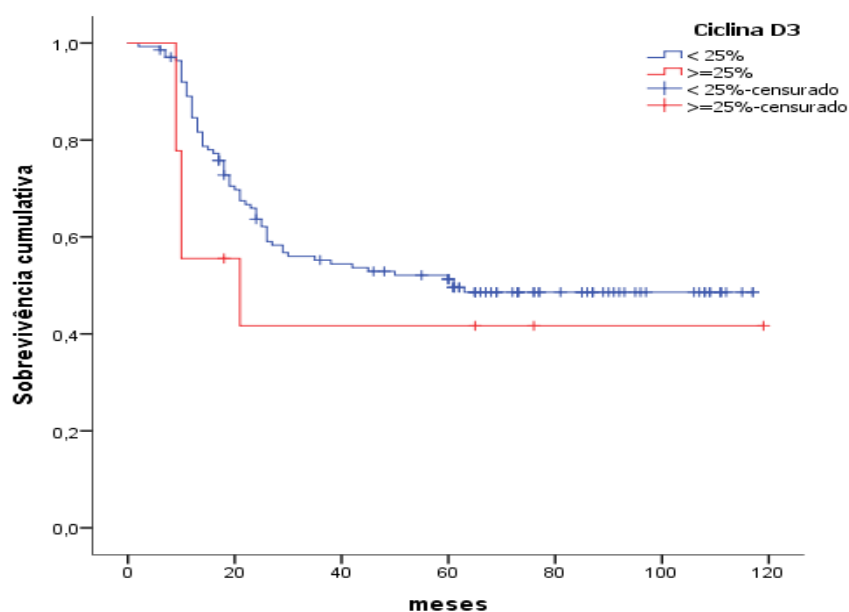


Figura 32 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes de face à recorrência considerando a expressão da ciclina D3.

5.5.3.7 - Bax

Analisa-se a expressão de Bax nas células tumorais considerando dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador (tabela 27 e figura 33).

Considerando a influência da expressão do Bax no tempo até à recorrência, concluímos, através da análise de Kaplan Meier, não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,060$), embora seja possível considerar um nível de tendência de significado estatístico ($p<0,10$).

No entanto, apesar dos resultados não atingirem significado estatístico para $p<0,05$, em termos meramente descritivos, os resultados sugerem que, para o grupo de doentes sem expressão de Bax ($n=89$), a incidência cumulativa de recorrência é maior que para os doentes com expressão de Bax ($n=58$), respetivamente 58% e 43%.

Tabela 27 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à recorrência

Tabela 27 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à sobrevivência						
Tempo (meses)	Bax Sem expressão (n= 89)*			Bax Com expressão (n=58)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	70	0,805	0,195	50	0,862	0,138
24	47	0,572	0,428	29	0,702	0,298
36	42	0,511	0,489	32	0,594	0,406
48	38	0,487	0,513	31	0,575	0,425
60	34	0.418	0,582	29	0,575	0,425
72	19	0.418	0,582	21	0,575	0,425
84	12	0.418	0,582	17	0,575	0,425
96	5	0.418	0,582	10	0,575	0,425
108	2	0.418	0,582	8	0,575	0,425
120	0	0.418	0,582	0	0,575	0,425
Tempo de sobrevivência mediano	38 meses			-----		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,060		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,531		
IC (95%)**				(0,387; 1,029)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

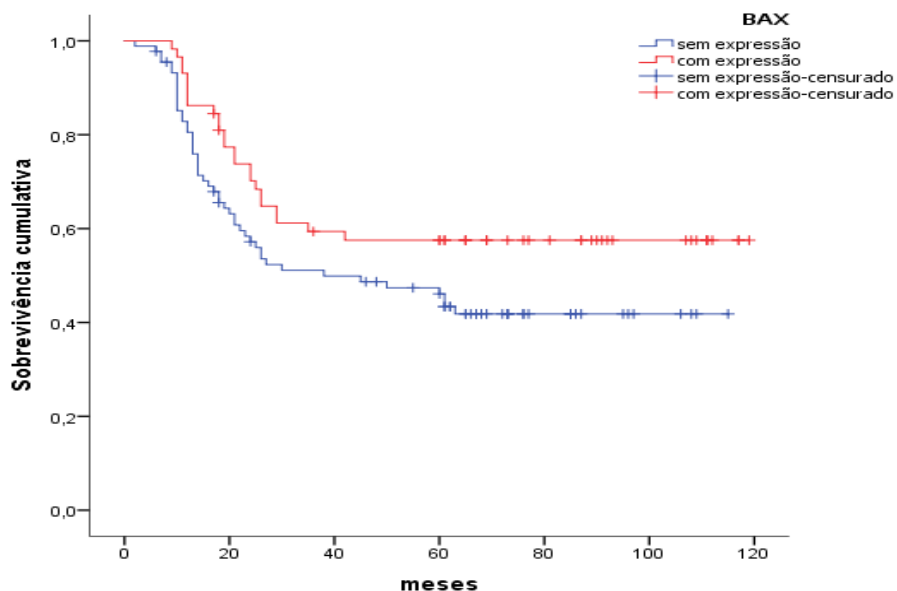


Figura 33 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do fígado à recorrência considerando a expressão de Bax.

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo sem expressão de Bax foi de 38 meses. Para o grupo com expressão de Bax, a curva de sobrevivência à recorrência não ultrapassa os 50% e como tal não se define tempo mediano de sobrevivência.

Estes resultados sugerem algum efeito *protetor* de expressão de Bax relativamente à recorrência.

5.5.3.8 - Bcl-2

Analisa-se a expressão do Bcl-2 nas células tumorais considerando dois grupos: com expressão de Bcl-2 e sem expressão do biomarcador.

Considerando o resultado da análise de Kaplan-Meier (tabela 28 e gráfico da figura 34) não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,13$).

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo sem expressão do biomarcador foi de 42 meses. Para o grupo com expressão do biomarcador, a curva de sobrevivência à recorrência tem uma descida menos acentuada, sem atingir os 50% e como tal não se define tempo mediano de sobrevivência.

Tabela 28 – Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bcl-2 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	Bcl-2 Sem expressão (n= 60)*			Bcl-2 Com expressão (n=87)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	45	0,776	0,224	75	0,862	0,138
24	30	0,546	0,454	56	0,675	0,325
36	27	0,509	0,491	47	0,567	0,433
48	25	0,490	0,510	44	0,543	0,457
60	22	0.451	0,549	41	0,543	0,457
72	12	0.408	0,592	28	0,529	0,471
84	8	0.408	0,592	20	0,529	0,471
96	5	0.408	0,592	10	0,529	0,471
108	2	0.408	0,592	8	0,529	0,471
120	0	0.408	0,592	0	0,529	0,471
Tempo de sobrevivência mediano	42 meses			----		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,128		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,702		
IC (95%)**				(0,443; 1,115)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

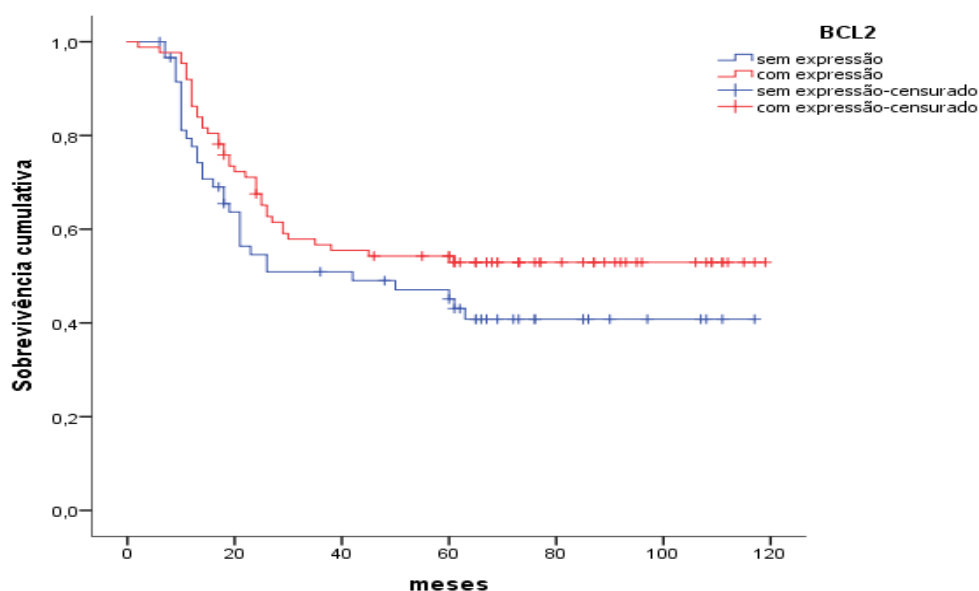


Figura 34 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de Bcl-2.

No entanto, apesar dos resultados não atingirem significado estatístico para $p < 0,05$, em termos meramente descritivos, os resultados mostram que a proporção de incidência cumulativa de recorrência é maior para o grupo de doentes sem expressão de Bcl-2

(n=60) do que para os doentes com expressão de Bcl-2 (n=87), com valores respetivamente de 60% e 47%.

5.5.3.9 - Caspase 3

Relativamente à expressão da caspase 3 nas células tumorais, consideramos dois grupos: com expressão do biomarcador ou sem expressão do biomarcador.

O resultado da influência da expressão da Caspase 3 no tempo até à recorrência (tabela 29 e figura 35), obtida através da análise de Kaplan Meier, não mostra diferenças estatisticamente significativas ($p=0,79$) entre os grupos comparativos.

Tabela 29 - Análise de Kaplan-Meier da expressão das caspases relativamente à recorrência

Tempo (meses)	Caspase 3 Sem expressão (n= 71)*			Caspase 3 Com expressão (n=76)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	59	0,844	0,156	61	0,813	0,187
24	42	0,653	0,347	44	0,598	0,402
36	35	0,544	0,456	39	0,544	0,456
48	33	0,513	0,487	36	0,530	0,470
60	29	0,497	0,503	34	0,515	0,485
72	18	0,497	0,503	22	0,498	0,502
84	10	0,497	0,503	19	0,498	0,502
96	5	0,497	0,503	10	0,498	0,502
108	3	0,497	0,503	7	0,498	0,502
120	0	0,497	0,503	0	0,498	0,502
Tempo de sobrevivência mediano	60 meses			63 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,791		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,940		
IC (95%)**				(0,594; 1,488)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

De forma similar, encontramos uma diferença mínima no tempo mediano de sobrevivência à recorrência com 63 meses para o grupo de doentes em que com expressão da caspase 3 (n=76), enquanto esse tempo é de 60 meses para o grupo de doente sem expressão da caspase 3.

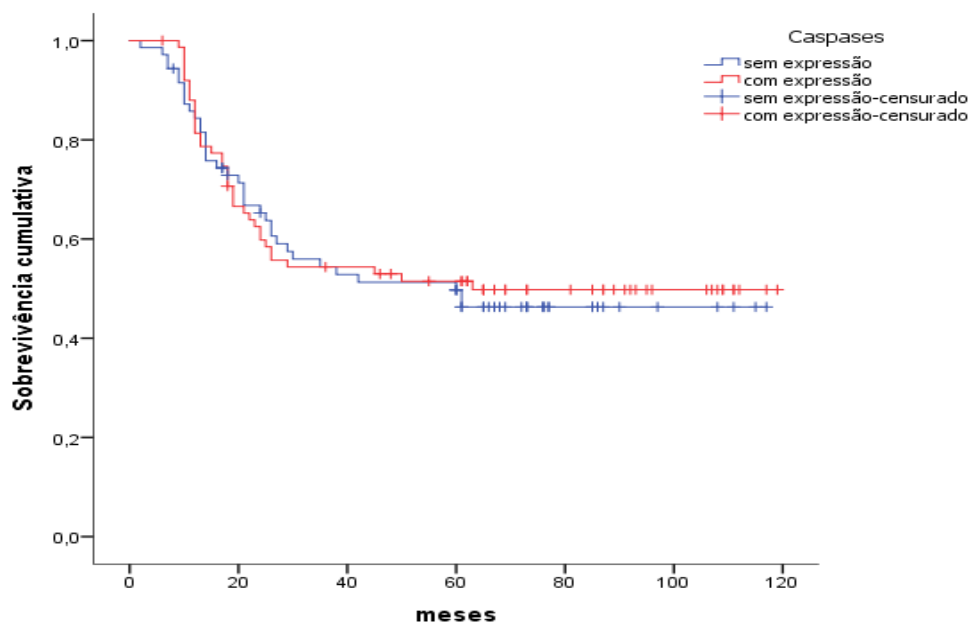


Figura 35 - Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência na análise da expressão tumoral da caspase 3

A observação das curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de Caspase 3 (figura 35) evidencia uma quase sobreposição das curvas nas duas categorias consideradas.

5.5.3.10 - CD 44

A expressão do biomarcador nas células tumorais leva-nos a considerar dois grupos de análise: com expressão de CD 44 e sem expressão de CD 44.

O resultado da influência da expressão de CD44 no tempo até à recorrência (tabela 30 e figura 36), obtida através da análise de Kaplan Meier, não mostra diferenças estatisticamente significativas ($p=0,943$) entre os grupos comparativos.

No entanto, salientamos que o tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo com expressão de CD44 foi de 38 meses, enquanto para o grupo sem expressão do biomarcador foi de 61 meses. Ainda assim, a observação das curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de CD 44 (figura 29) evidencia uma quase sobreposição das curvas nas duas categorias consideradas.

Tabela 30 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CD 44 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	CD 44 Sem expressão (n= 107)*			CD 44 Com expressão (n=40)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	87	0,821	0,179	33	0,846	0,156
24	65	0,630	0,370	21	0,604	0,396
36	56	0,553	0,447	18	0,517	0,483
48	52	0,533	0,447	18	0,489	0,511
60	47	0.512	0,488	16	0,456	0,544
72	31	0.491	0,509	9	0,456	0,544
84	23	0.491	0,509	6	0,456	0,544
96	10	0.491	0,509	5	0,456	0,544
108	6	0.491	0,509	3	0,456	0,544
120	0	0.491	0,509	0	0,456	0,544
Tempo de sobrevivência mediano	61 meses			38 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,943		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,019		
IC (95%)**				(0,609; 1,705)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

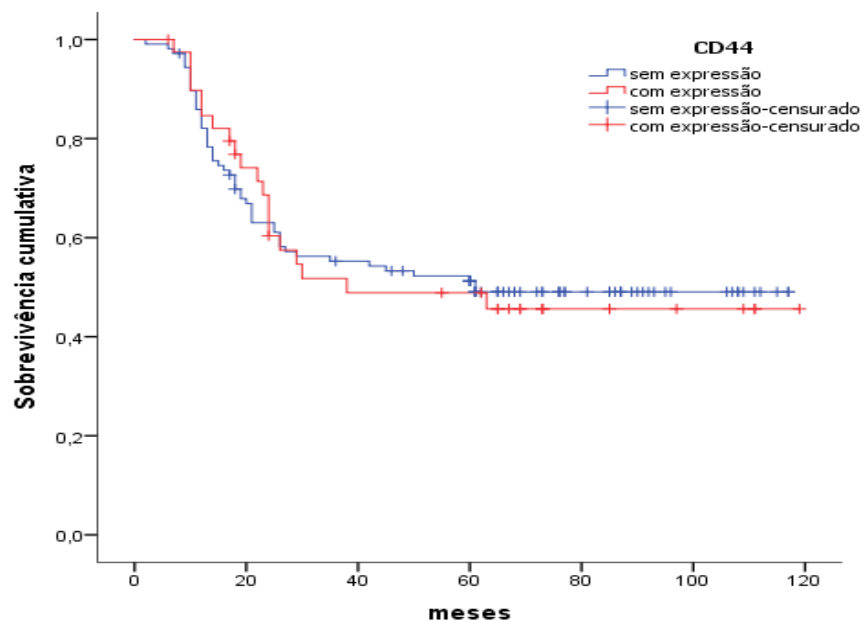


Figura 36 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de CD44

5.5.3.11- ErbB-2/HER2

Também na análise da expressão do biomarcador ErbB-2 nas células tumorais consideramos dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão do ErbB-2 no tempo até à recorrência (tabela 31 e figura 37), praticamente não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,909$) entre os grupos comparativos.

Tabela 31 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de ErbB-2 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	ErbB-2 Sem expressão (n= 43)*			ErbB-2 Com expressão (n=104)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	35	0,814	0,186	85	0,834	0,166
24	29	0,674	0,326	57	0,601	0,399
36	22	0,535	0,465	52	0,548	0,452
48	20	0,511	0,489	49	0,527	0,473
60	17	0,485	0,515	46	0,516	0,484
72	13	0,485	0,515	27	0,481	0,519
84	8	0,485	0,515	21	0,481	0,519
96	3	0,485	0,515	14	0,481	0,519
108	2	0,485	0,515	8	0,481	0,519
120	0	0,485	0,515	0	0,481	0,519
Tempo de sobrevivência mediano	50 meses			61 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,909		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,971		
IC (95%)**				(0,589; 1,602)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo sem expressão do biomarcador foi de 50 meses e de 61 meses para o grupo com expressão de ErbB-2.

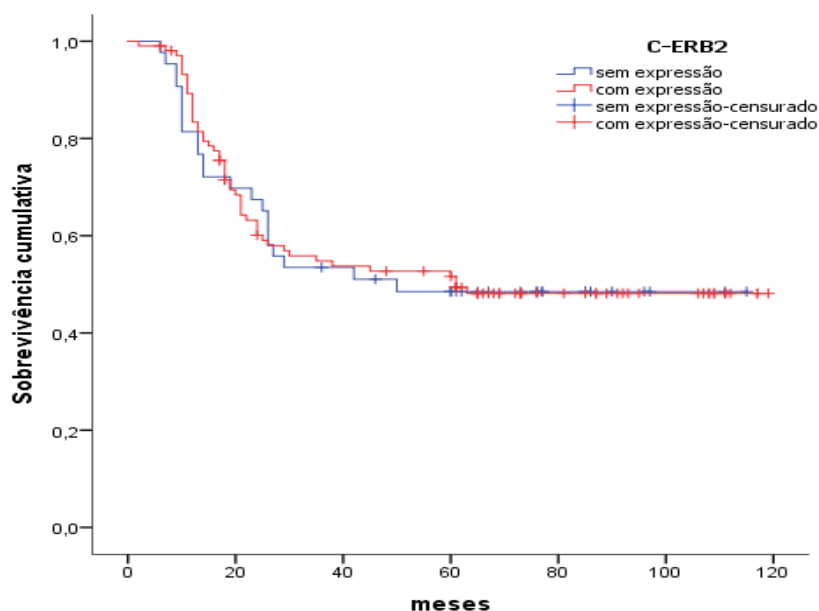


Figura 37 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de ErbB-2.

5.5.3.12 - CK 5/6

Analisa-se a expressão de CK 5/6 nas células tumorais considerando dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Como podemos observar na tabela 32 e nas curvas de sobrevivência representadas no gráfico da figura 38, o resultado da análise de Kaplan Meier efetuada não mostra diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos na influência da expressão de CK 5/6 no tempo até à recorrência ($p=0,779$).

Salienta-se a diferença encontrada nos tempos de sobrevivência mediana à recorrência. O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo sem expressão de CK 5/6 foi de 60 meses, enquanto para o grupo com expressão do biomarcador ($n=26$), o tempo mediano de sobrevivência à recorrência foi de 42 meses.

A mediana de sobrevivência à recorrência para o grupo sem expressão do biomarcador foi de 61 meses e de 42 meses para o grupo com expressão de CK 5/6.

Tabela 32 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 5/6 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	CK 5/6 Sem expressão (n= 121)*			CK 5/6 Com expressão (n=26)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	99	0,825	0,175	21	0,840	0,131
24	69	0,597	0,403	17	0,758	0,351
36	62	0,545	0,455	12	0,535	0,456
48	58	0,528	0,472	11	0,490	0,510
60	52	0.509	0,491	11	0,490	0,510
72	34	0.479	0,521	6	0,490	0,510
84	24	0.479	0,521	5	0,490	0,510
96	12	0.479	0,521	3	0,490	0,510
108	9	0.479	0,521	1	0,490	0,510
120	0	0.479	0,521	0	0,490	0,510
Tempo de sobrevivência a mediano	61 meses			42 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,779		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,916		
IC (95%)**				(0,493; 1,702)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

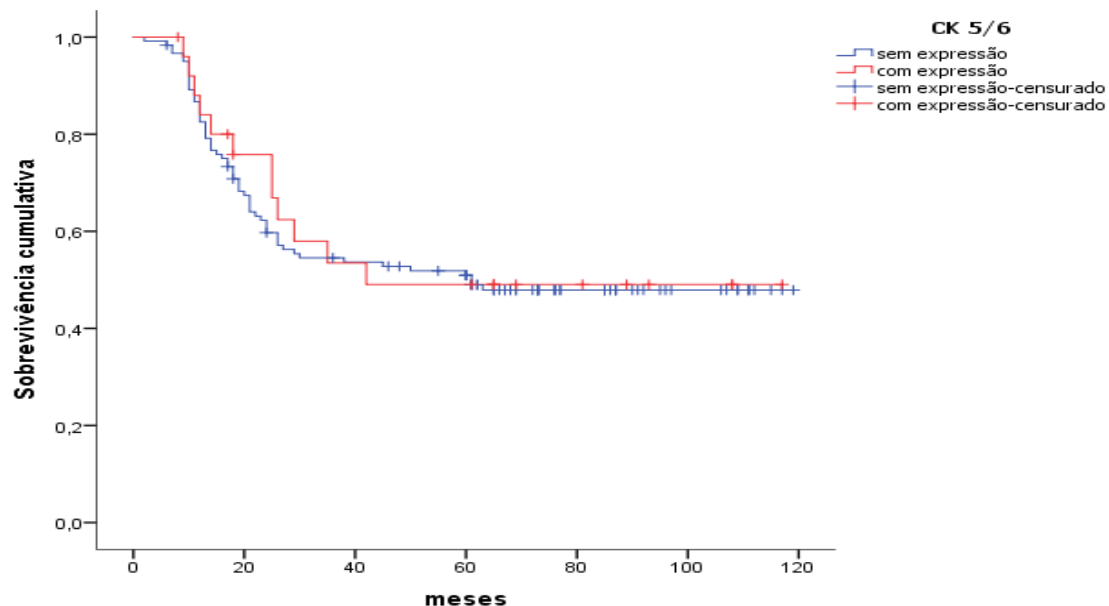


Figura 38 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de CK 5/6.

5.5.3.13 - CK 20

Em relação à expressão de CK 20 nas células tumorais consideramos dois grupos para análise: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Quando consideramos a influência da expressão de CK 20 no tempo até à recorrência na análise de Kaplan Meier (tabela 33 e figura 39), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

A expressão do CK 20 (n=38) nas células neoplásicas está associada a uma taxa de incidência cumulativa de recorrência da doença de 64% enquanto o grupo dos doentes cujo tumor não expressa CK 20 (n=109) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de 47% [$p=0,032$, *hazard ratio* de 1,69, IC 95% (1,035; 2,762)]. Estes resultados sugerem que a expressão de CK 20 pelo tumor é um fator de risco para a progressão do CUB, com uma magnitude de 1,7 vezes.

Tabela 33 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 20 relativamente à recorrência

Tempo (meses)	CK 20 Sem expressão (n= 109)*			CK 20 Com expressão (n=38)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	89	0,832	0,168	31	0,816	0,184
24	71	0,690	0,310	15	0,428	0,572
36	62	0,613	0,387	12	0,344	0,636
48	57	0,583	0,417	12	0,344	0,636
60	52	0,562	0,438	11	0,344	0,636
72	34	0,529	0,471	6	0,344	0,636
84	24	0,529	0,471	5	0,344	0,636
96	13	0,529	0,471	2	0,344	0,636
108	9	0,529	0,471	1	0,344	0,636
120	0	0,529	0,471	0	0,344	0,636
Tempo de sobrevivência mediano	-----			22 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,032		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,690		
IC (95%)**				(1,035; 2,762)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Também o tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o grupo com expressão do biomarcador foi de 22 meses.

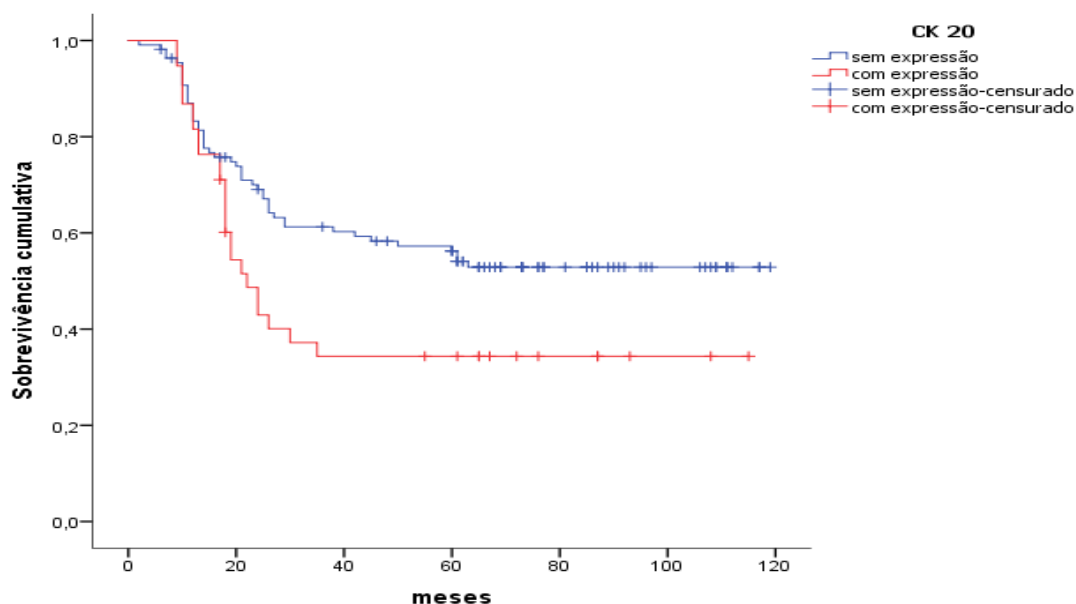


Figura 39 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando a expressão de CK 20

Para o grupo sem expressão de CK 20 a curva de sobrevivência à recorrência apresenta uma descida menos acentuada, não ultrapassando os 50%, portanto, sem tempo mediano de sobrevivência. A observação das curvas de sobrevivência à recorrência relativamente à expressão de CK20 (figura 39) objetiva os resultados.

5.5.3.14 - Fenótipo Molecular

A variável fenótipo molecular para o CBUNMI tem por base um classificador que utiliza dois biomarcadores detetados por métodos de imunohistoquímica, o CK5/6 e o CK20. A operacionalização desta variável resulta da classificação dos tumores em quatro subgrupos baseados na imunorreatividade aos biomarcadores CK20 e / ou CK5/6, definindo uma variável com as categorias:

- Nulo (CK20-, CK5/6-)
- Misto (CK20+, CK5/6+)
- Basal (CK20-, CK5/6+)
- Luminal (CK20+, CK5/6-)

Como podemos observar na tabela 34 e nas curvas de sobrevivência representadas no gráfico da figura 40, o resultado da análise de Kaplan Meier efetuada mostra diferenças

estatisticamente significativas entre os grupos comparativos no tempo até à recorrência ($p=0,02$, teste Log Rank).

Nesta classificação do fenótipo molecular do CUNMIB, o grupo comparador para a regressão de Cox é fenótipo “nulo”, isto é, sem expressão dos biomarcadores.

Os doentes com o fenótipo “luminal” ($n=32$) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de recorrência da doença de 72% *versus* 45% para o fenótipo “nulo” [$p=0,005$, *hazard ratio* de 2,15; IC 95% (1,189; 3,165)].

Os resultados encontrados para os fenótipos “misto” e “basal” não atingiram significado estatístico para $p<0,05$, no entanto, em termos meramente descritivos, observamos que, para o grupo de doentes com tumor com fenótipo “basal” ($n=20$), a incidência cumulativa de recorrência é de 57% e para o fenótipo “misto” ($n=6$) é de 33%. Estes resultados sugerem a possibilidade de o fenótipo “basal” constituir um fator de risco para a recorrência do CUNMIB, no entanto, sem atingir significado estatístico.

Como se pode observar no gráfico da figura 40, as curvas de sobrevivência à recorrência para os fenótipos nulo e misto apresentam uma descida pouco acentuada, nunca ultrapassando os 50% e como tal não existindo tempo mediano de sobrevivência.

O tempo mediano de sobrevivência à recorrência para o fenótipo basal é de 29 meses e para o fenótipo luminal é de 19 meses, sugerindo que recorrência tumoral é mais frequente (72% dos doentes) mas também mais precoce.

Todos os casos de recorrência no fenótipo basal ocorreram até aos 30 meses após o diagnóstico.

Tabela 34 - Análise de Kaplan-Meier da expressão fenotípica relativamente à recorrência

Tempo (meses)	FENÓTIPO MOLECULAR											
	Nulo (n=89)*			Misto (n=6)			Basal (n=20)			Luminal (n=32)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	74	0,841	0,159	6	1,000	0,000	15	0,789	0,211	25	0,781	0,219
24	59	0,682	0,318	5	0,833	0,167	12	0,737	0,263	10	0,349	0,651
36	54	0,636	0,364	4	0,667	0,333	8	0,491	0,509	8	0,279	0,721
48	50	0,612	0,388	4	0,667	0,333	7	0,430	0,570	8	0,279	0,721
60	45	0,588	0,418	4	0,667	0,333	7	0,430	0,570	8	0,279	0,721
72	30	0,547	0,453	3	0,667	0,333	4	0,430	0,570	4	0,279	0,721
84	21	0,547	0,453	3	0,667	0,333	3	0,430	0,570	3	0,279	0,721
96	11	0,547	0,453	1	0,667	0,333	2	0,430	0,570	1	0,279	0,721
108	8	0,547	0,453	0	0,667	0,333	1	0,430	0,570	1	0,279	0,721
120	0	0,547	0,453	0	0,667	0,333	0	0,430	0,570	0	0,279	0,721
Tempo de sobrevivência mediano	--			--			29 meses			19 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank) 0,021												
HR (Hazard Ratio)	1,000			0,638			1,344			2,145		
IC (95%)**	----			(0,154; 2,644)			(0,670; 2,694)			(1,265; 3,637)		
Valor de <i>p</i> (Wald)				0,536			0,405			0,005		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

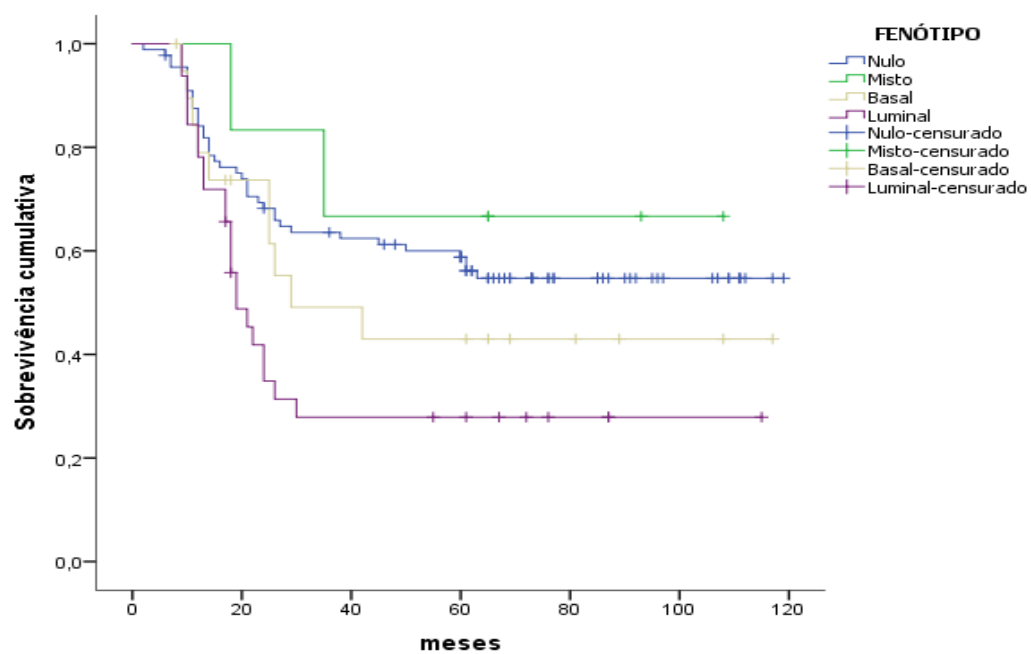


Figura 40 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à recorrência considerando o Fenótipo molecular

5.5.4 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico nos resultados da recorrência tumoral

Na tabela 35 apresentamos os resultados mais importantes da análise da influência dos fatores de prognóstico relativamente à recorrência da doença nos doentes estudados. Os fatores de prognóstico com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou próximo de significado estatístico ($p < 0,10$) estão destacados e constituem os fatores de prognóstico a integrar na análise multivariável.

Tabela 35 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico face à recorrência tumoral

Variável (fator de prognóstico)	valor de p (Log Rank)	Hazard Ratio	IC 95%**
Idade (<70 anos* / ≥70 anos)	0,694	0,911	(0,570; 1,456)
Sexo (M*/F)	0,424	1,324	(0,659; 2,661)
D. tumor (< 3 cm* / ≥3 cm)	0,034	1,727	(1,031; 2,994)
Estádio (Ta*/T1)	0,006	1,940	(1,189; 3,165)
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	2,382	(1,502; 3,777)
Ki67 (< 20%* / ≥ 20%)	0,030	1,877	(1,047; 3,367)
P53 (< 20%* / ≥ 20%)	0,470	0,940	(0,594; 1,488)
P21 (< 5%* / ≥ 5%)	0,921	1,025	(0,625; 1,681)
P27 (< 25%* / ≥ 25%)	0,883	0,966	(0,610; 1,531)
Ciclina D1 (< 25%* / ≥ 25%)	0,008	2,240	(1,202; 4,172)
Ciclina D3 (< 25%* / ≥ 25%)	0,299	1,603	(0,646; 3,679)
Caspases (sem expressão* / com expressão)	0,791	0,940	(0,594; 1,488)
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,060	0,531	(0,387; 1,029)
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	0,128	0,702	(0,443; 1,115)
CD44 (sem expressão* / com expressão)	0,943	1,019	(0,609; 1,705)
ErbB-2 (sem expressão* / com expressão)	0,909	0,971	(0,589; 1,602)
CK 5/6 (sem expressão* / com expressão)	0,779	0,916	(0,493; 1,702)
CK20 (sem expressão* / com expressão)	0,032	1,690	(1,035; 2,762)
Fenótipo (N*/M/B/L) ***	0,029	--	--
Nulo*	--	--	--
Misto	0,536#	0,638	(0,154; 2,644)
Basal	0,405#	1,344	(0,670; 2,694)
Luminal	0,005#	2,145	(1,265; 3,637)

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

*** Fenótipo: Nulo/Misto/ Basal/ Luminal

valor de p (Wald)

5.6 - Análise dos fatores de prognóstico nos resultados da progressão tumoral

No próximo capítulo vamos proceder à análise dos resultados das variáveis de prognóstico face à progressão tumoral. Também neste capítulo utilizaremos a análise de Kaplan Meier e a regressão de Cox para determinar o *hazard ratio* com o grupo *comparador*. Para cada uma das variáveis independentes consideradas, os grupos de análise serão semelhantes aos descritos no capítulo anterior. Consideraremos também o tempo mediano de sobrevivência à progressão como um fator discriminativo. As proporções de incidência ou sobrevivência cumulativas comentadas são aos 120 meses.

Iniciaremos a nossa análise pelas variáveis sociodemográficas seguidas das variáveis histopatológicas e finalmente pelos biomarcadores moleculares.

No final do capítulo apresentamos o resumo dos resultados relevantes com a indicação das variáveis que se revelaram estatisticamente significativas para $p < 0,05$ e que serão as variáveis integradas no modelo de análise multivariável de Cox.

5.6.1 - Análise dos fatores de prognóstico sociodemográficos nos resultados da progressão tumoral

5.6.1.1 - Idade

O resultado da análise de Kaplan Meier da influência da idade no tempo até à progressão da doença (tabela 36 e figura 41) não mostra diferenças estatisticamente significativas ($p=0,150$) entre os grupos comparativos. Em termos estritamente descritivos, os resultados obtidos mostram diferenças: para o grupo de doentes com idade inferior a 70 anos, a incidência cumulativa da progressão é menor que para os doentes com idade ≥ 70 anos, respetivamente 16% e 24,4%. No entanto, estes resultados não atingiram significado estatístico para $p < 0,05$.

Tabela 36 - Análise de Kaplan-Meier da idade face à progressão

Tempo (meses)	Idade < 70 anos (n=83)*			Idade ≥ 70 anos (n=64)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	83	1,000	0,000	58	0,935	0,065
24	80	0,976	0,034	50	0,885	0,115
36	73	0,914	0,086	46	0,814	0,186
48	70	0,877	0,113	38	0,777	0,223
60	63	0,839	0,161	35	0,756	0,244
72	44	0,839	0,161	29	0,756	0,244
84	31	0,839	0,161	24	0,756	0,244
96	16	0,839	0,161	13	0,756	0,244
108	12	0,839	0,161	7	0,756	0,244
120	0	0,839	0,161	0	0,756	0,244
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,150		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,726		
IC (95%)**				(0,811; 3,674)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Como se pode observar no gráfico da figura 41, as curvas de sobrevivência à progressão para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

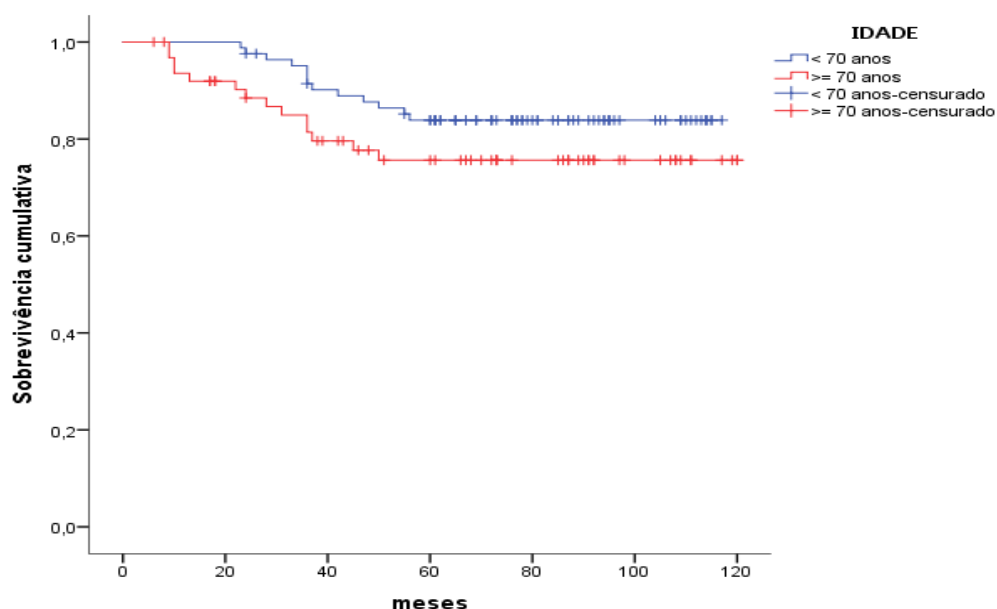


Figura 41 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com idade < 70 anos *versus* doentes com idade ≥ 70 anos face à progressão

5.6.1.2 - Sexo

Da análise de Kaplan Meier da influência do sexo no tempo até à progressão (tabela 37) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,062$), embora seja possível considerar um nível de tendência de significado estatístico ($p<0,10$).

Salientamos que não foi registada qualquer progressão da doença nas mulheres durante o período de observação.

Tabela 37 - Análise de Kaplan-Meier do sexo face à progressão

Tempo (meses)	Masculino (n=130)*			Feminino (n=17)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	126	0,969	0,031	15	1,000	0,000
24	116	0,930	0,070	14	1,000	0,000
36	105	0,857	0,143	14	1,000	0,000
48	94	0,815	0,185	14	1,000	0,000
60	87	0,781	0,219	12	1,000	0,000
72	63	0,781	0,219	10	1,000	0,000
84	48	0,781	0,219	7	1,000	0,000
96	25	0,781	0,219	4	1,000	0,000
108	17	0,781	0,219	2	1,000	0,000
120	0	0,781	0,219	1	1,000	0,000
Valor de p (Log Rank)				0,062		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,041		
IC (95%)**				(0,000; 7,620)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A proporção de incidência cumulativa da progressão da doença foi de 22%, não ocorrendo após os 60 meses.

Também em relação à influência do género no tempo até à progressão, com se pode observar no gráfico da figura 42, as curvas de sobrevivência à progressão para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

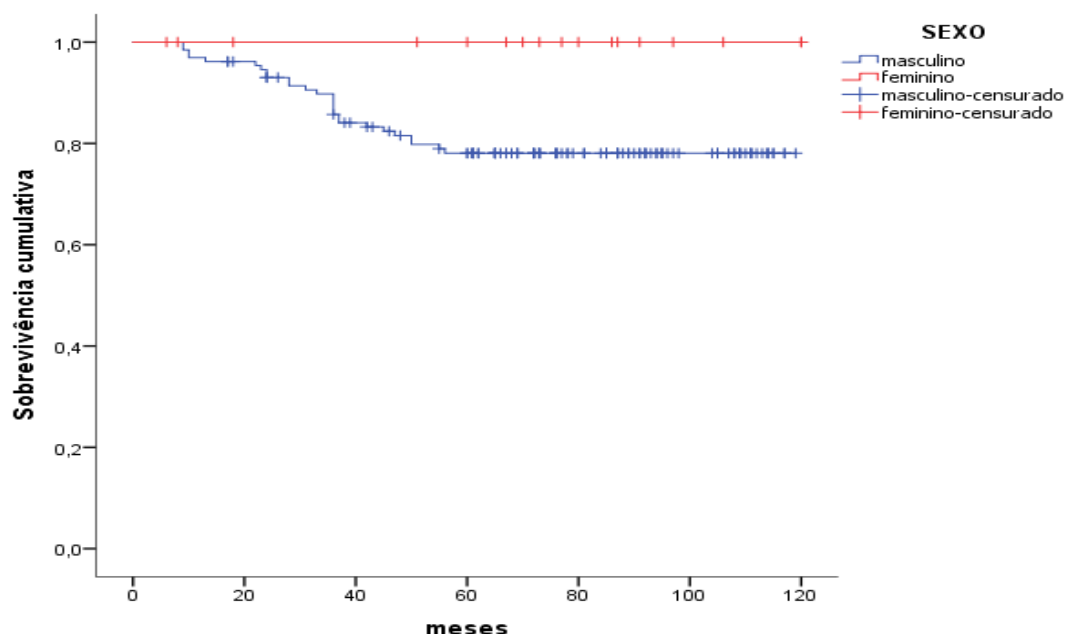


Figura 42 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do sexo masculino *versus* doentes do sexo feminino face à progressão.

5.6.2 - Análise dos fatores de prognóstico clínico-patológicos nos resultados da progressão tumoral

5.6.2.1 - Diâmetro tumoral

Considerámos dois subgrupos de análise: doentes com tumor inferior a 3 centímetros e doentes com tumor maior ou igual a 3 centímetros.

O resultado da influência da dimensão do tumor vesical observado no tempo até à progressão no tempo até à progressão (tabela 38 e figura 43), obtida através da análise de Kaplan Meier, não mostra diferenças estatisticamente significativas ($p=0,162$) entre os grupos comparativos.

No entanto, em termos estritamente descritivos, os resultados obtidos mostram diferenças: para o grupo de doentes nos quais se verificou uma dimensão do tumor ≥ 3 cm apresentam inferior sobrevivência à progressão com uma proporção de incidência cumulativa de progressão da doença de 23% enquanto o subgrupo de doentes com tumor < 3 cm apresenta uma taxa de incidência cumulativa de 14%.

Tabela 38 - Análise de Kaplan-Meier do diâmetro tumoral face à progressão

Tempo (meses)	Tumor < 3 cm (n=51)*			Tumor ≥ 3 cm (n=96)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	51	1,000	0,000	90	0,957	0,043
24	50	0,980	0,020	80	0,913	0,078
36	47	0,941	0,059	72	0,832	0,168
48	45	0,921	0,097	63	0,785	0,215
60	39	0,858	0,142	60	0,773	0,227
72	26	0,858	0,142	47	0,773	0,227
84	21	0,858	0,142	34	0,773	0,227
96	11	0,858	0,142	18	0,773	0,227
108	7	0,858	0,142	13	0,773	0,227
120	0	0,858	0,142	0	0,773	0,227
Valor de p (Log Rank)				0,162		
HR (Hazard Ratio)				1,827		
IC (95%)**				(0,772; 4,324)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Como se pode observar no gráfico da figura 43, as curvas de sobrevivência à progressão para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

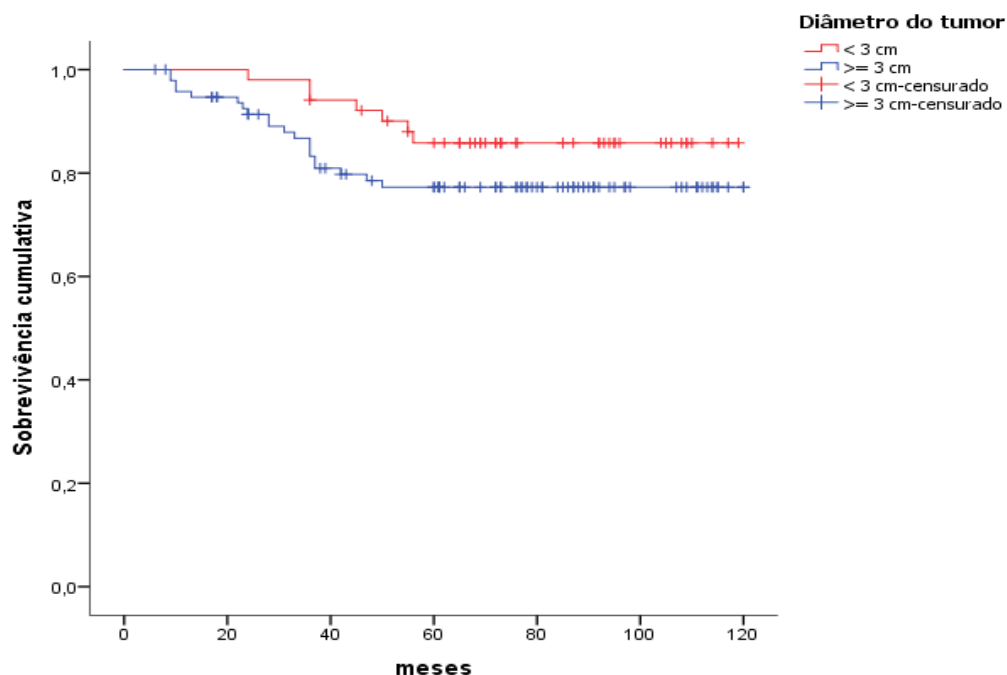


Figura 43 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a dimensão tumoral

5.6.2.2 - Estádio

Como anteriormente, relativamente ao estágio do tumor, consideramos dois grupos, os doentes com Ta e os doentes com T1 relativamente à progressão tumoral.

A influência do estágio (Ta, T1) no tempo até à recorrência na análise de Kaplan Meier (tabela 39), mostra a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Os doentes com T1 apresentam uma taxa de incidência cumulativa de progressão da doença de 49% enquanto os doentes com Ta apresentam uma taxa de incidência cumulativa de 9,7% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 6,24, IC 95% (2,851; 13,650)]. Estes resultados sugerem que o estágio T1 é um fator de risco para a progressão do CUB, com uma magnitude acrescida de 6 vezes.

Tabela 39 - Análise de Kaplan-Meier do Estádio face à progressão

Tempo (meses)	Ta (n=110)*			T1 (n=37)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	107	0,982	0,018	34	0,944	0,056
24	101	0,972	0,028	29	0,831	0,169
36	95	0,933	0,067	24	0,688	0,312
48	89	0,923	0,077	19	0,569	0,431
60	82	0,903	0,097	17	0,509	0,491
72	61	0,903	0,097	12	0,509	0,491
84	45	0,903	0,097	9	0,509	0,491
96	25	0,903	0,097	4	0,509	0,491
108	17	0,903	0,097	2	0,509	0,491
120	0	0,903	0,097	0	0,509	0,491
Valor de p (Log Rank)				<0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				6,238		
IC (95%)**				(2,851; 13,650)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 44 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

No entanto, para ambos os grupos, as curvas de sobrevivência à progressão apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

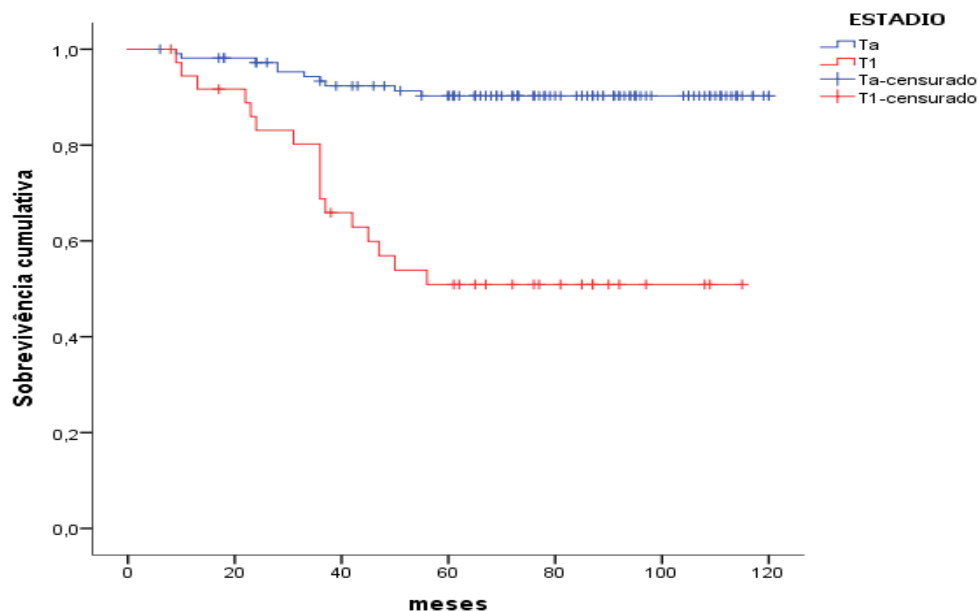


Figura 44 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com estágio Ta *versus* T1 face à progressão

5.6.2.3 - Grau histológico

Consideramos, como anteriormente, dois grupos para análise relativamente ao grau do tumor: doentes com tumor de baixo grau e doentes com tumor de alto grau.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do grau histológico observada no tempo até à recorrência (tabela 40), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

De facto, os doentes com tumor de alto grau apresentam uma proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença de 43% enquanto para os doentes com tumor de baixo grau este valor é de 6,8% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 7,85, IC 95% (3,166; 19,481)].

Estes resultados sugerem que o alto grau histológico é um fator de risco para a progressão do CUBNMI, com uma magnitude acrescida de 7,8 vezes.

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 45 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

As curvas de sobrevivência à progressão para ambos os grupos apresentam uma descida que não atinge os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

Tabela 40 - Análise de Kaplan-Meier do grau histológico relativamente à progressão

Tempo (meses)	Baixo Grau (n=95)*			Alto Grau (n=52)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	94	1,000	0,000	47	0,922	0,078
24	89	0,989	0,011	41	0,840	0,160
36	84	0,944	0,056	36	0,738	0,262
48	79	0,944	0,056	29	0,632	0,368
60	73	0,932	0,068	26	0,566	0,434
72	54	0,932	0,068	19	0,566	0,434
84	39	0,932	0,068	16	0,566	0,434
96	22	0,932	0,068	7	0,566	0,434
108	15	0,932	0,068	4	0,566	0,434
120	0	0,932	0,068	0	0,566	0,434
Valor de p (Log Rank)				<0,001		
HR (Hazard Ratio)				7,853		
IC (95%)**				(3,166; 19,481)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

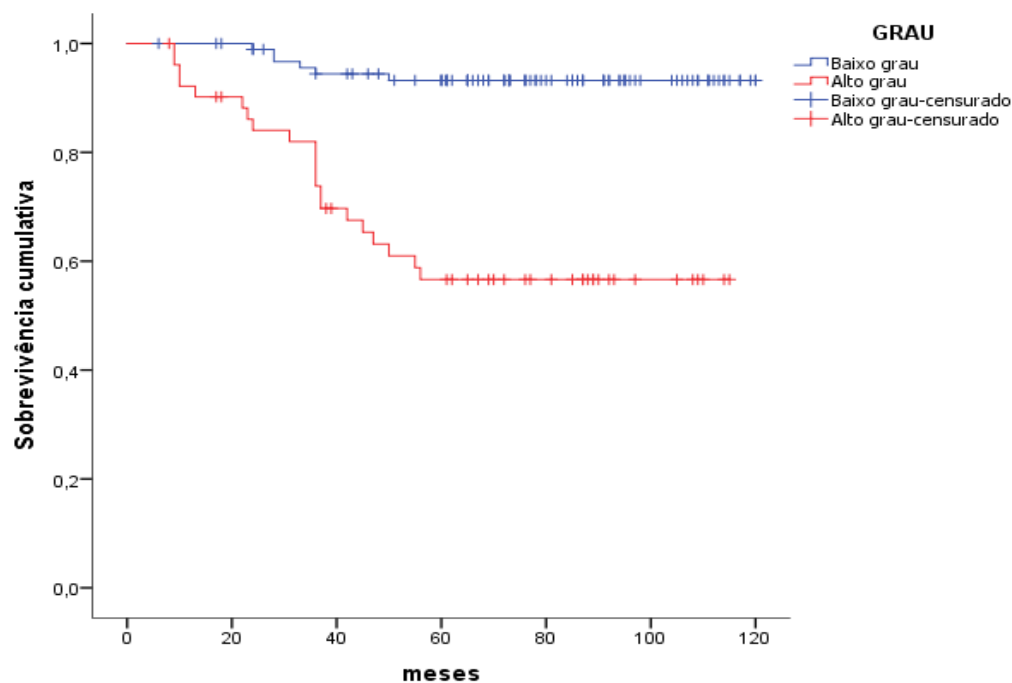


Figura 45 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com tumores de alto grau versus doentes com tumor de baixo grau histológico relativamente à progressão

5.6.3 - Análise da expressão dos biomarcadores moleculares nos resultados da progressão tumoral

5.6.3.1 - Ki-67

Analisa-se a expressão do Ki-67 tendo em conta as duas categorias consideradas, utilizando o valor de *cutoff* de 20%.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão de Ki-67 observada no tempo até à progressão (tabela 41), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Assim, para os doentes com expressão de Ki-67 $\geq 20\%$ (n= 22) a proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença é de 38% enquanto para o grupo dos doentes com expressão de Ki-67 $< 20\%$ (n= 125) a proporção de incidência cumulativa é de 16% [p=0,006, *hazard ratio* de 2,99, IC 95% (1,306; 6,830)].

Tabela 41 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ki-67 relativamente à progressão

Tempo (meses)	Ki-67 Expressão < 20% (n=125)*			Ki-67 Expressão $\geq 20\%$ (n= 22)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	122	0,992	0,008	19	0,864	0,136
24	115	0,967	0,033	16	0,770	0,230
36	105	0,899	0,101	14	0,719	0,281
48	96	0,873	0,127	12	0,616	0,384
60	87	0,836	0,163	12	0,616	0,384
72	66	0,836	0,163	7	0,616	0,384
84	49	0,836	0,163	6	0,616	0,384
96	26	0,836	0,163	3	0,616	0,384
108	17	0,836	0,163	2	0,616	0,384
120	0	0,836	0,163	0	0,616	0,384
Valor de p (Log Rank)				0,006		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				2,987		
IC (95%)**				(1,306; 6,830)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Como se pode observar no gráfico da figura 46, as curvas de sobrevivência à progressão, para ambos os grupos, apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

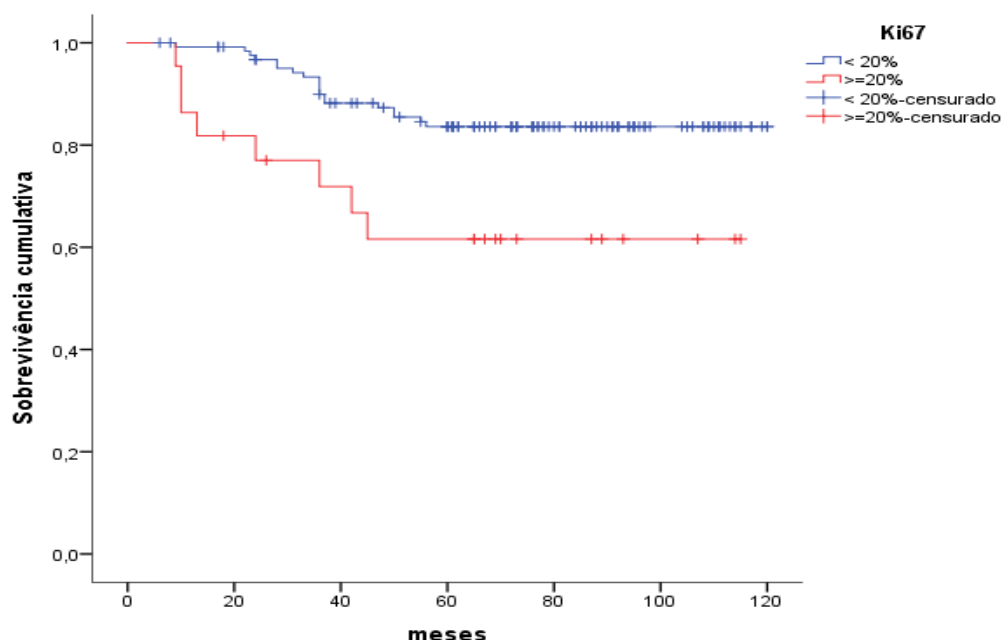


Figura 46 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão do Ki-67

5.6.3.2 - p53

A expressão de p53 é analisada considerando os dois grupos de análise resultantes da aplicação do cutoff de 20%. Após a análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão do p53 no tempo até à progressão (tabela 42 e figura 47), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,823$).

Também relativamente à incidência cumulativa de progressão da doença, o valor observado é praticamente semelhante para os dois grupos.

Como podemos observar as curvas de sobrevivência à recorrência são praticamente sobreponíveis e com uma descida pouco acentuada, objetivando a inexistência de diferenças estatisticamente significativas na comparação dos dois grupos em análise.

Tabela 42 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p53 relativamente à progressão

Tempo (meses)	p53 Expressão < 20% (n=123)*			p53 Expressão ≥ 20% (n= 24)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	117	0,967	0,033	24	1,000	0,000
24	109	0,942	0,058	21	0,917	0,083
36	99	0,864	0,156	20	0,917	0,083
48	91	0,837	0,163	17	0,822	0,178
60	82	0,800	0,200	17	0,822	0,178
72	60	0,800	0,200	13	0,822	0,178
84	44	0,800	0,200	11	0,822	0,178
96	23	0,800	0,200	6	0,822	0,178
108	14	0,800	0,200	5	0,822	0,178
120	0	0,800	0,200	0	0,822	0,178
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,823		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,886		
IC (95%)**				(0,306; 2,563)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

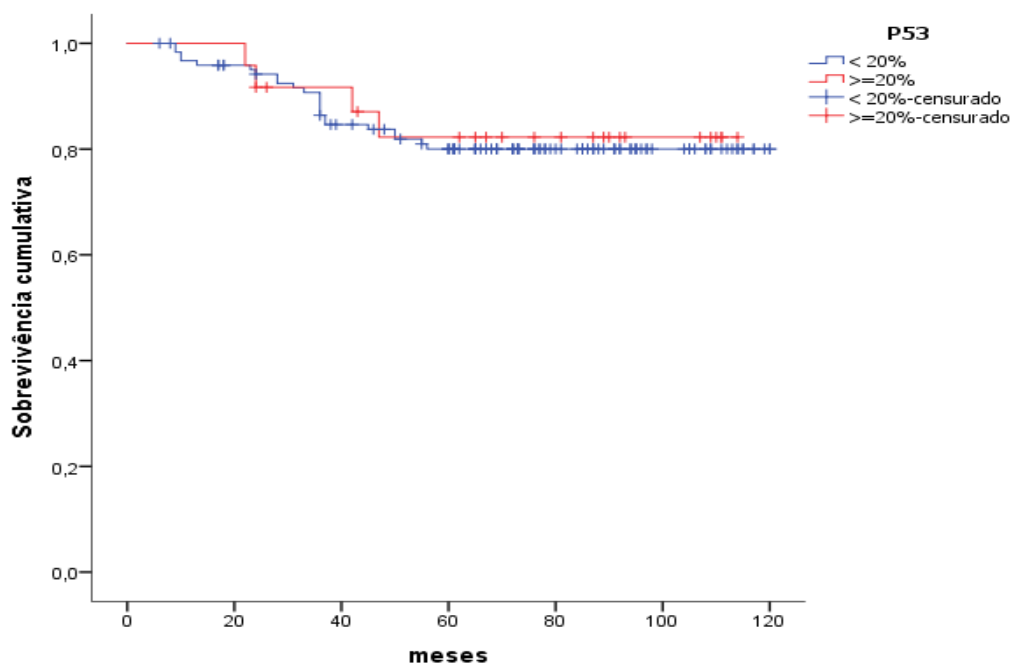


Figura 47 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de p53

5.6.3.3 - p21

Para a análise da expressão de p21, como anteriormente, consideramos dois grupos: os doentes com tumores com expressão de p21 < 5% e os doentes cujas células tumorais expressam p21 acima dos 5%.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,226$), pela análise de Kaplan Meier, na avaliação da influência da expressão do p21 no tempo até à progressão (tabela 43 e figura 48).

Relativamente à incidência cumulativa de progressão da doença, o valor observado é de 22% para o grupo cuja expressão de p21 é mais elevada e de 15% para o grupo com expressão menor expressão do biomarcador, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa.

Tabela 43 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p21 relativamente à progressão

Tempo (meses)	p21 Expressão < 5% (n=47)*			p21 Expressão ≥ 5% (n= 100)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	46	1,000	0,000	95	0,960	0,040
24	43	0,978	0,022	87	0,918	0,082
36	41	0,956	0,046	78	0,832	0,168
48	35	0,932	0,068	73	0,790	0,210
60	31	0,852	0,148	68	0,779	0,221
72	23	0,852	0,148	51	0,779	0,221
84	18	0,852	0,148	37	0,779	0,221
96	8	0,852	0,148	21	0,779	0,221
108	6	0,852	0,148	13	0,779	0,221
120	0	0,852	0,148	0	0,779	0,221
Valor de p (Log Rank)				0,226		
HR (Hazard Ratio)				1,735		
IC (95%)**				(0,700; 4,298)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A expressão gráfica do comportamento das curvas de sobrevivência à recorrência pode ser observada na figura 48, salientando-se uma descida pouco acentuada em ambos os grupos comparativos.

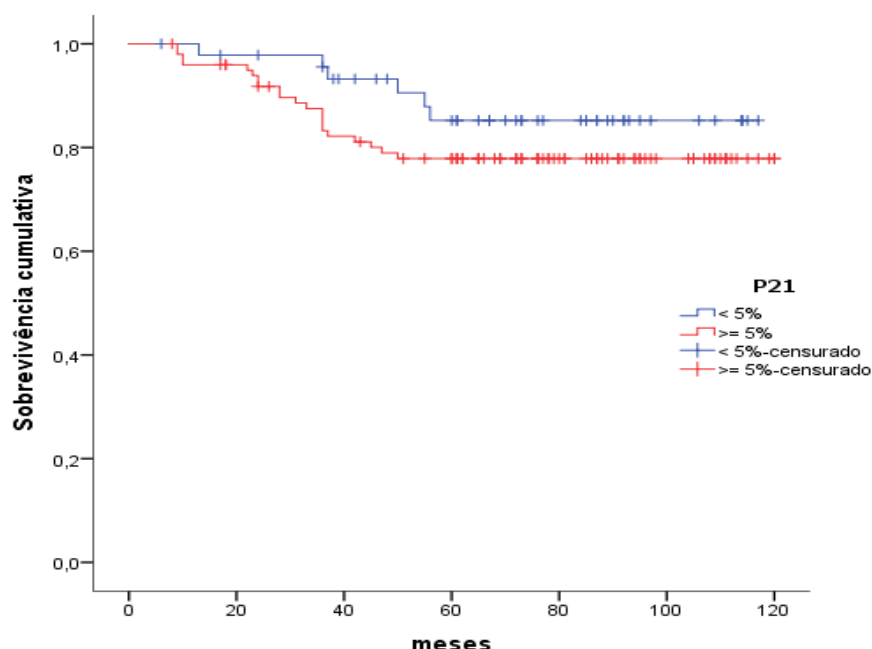


Figura 48 - Comparação entre curvas de sobrevivência à progressão considerando a expressão de p21

5.6.3.4 - p27

O resultado da análise de sobrevivência à progressão não mostra diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos (valor de $p=0,947$ no teste de *Log Rank* na análise de Kaplan-Meier) com se pode observar na tabela 44.

Tabela 44 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p27 relativamente à progressão

Tempo (meses)	p27 Expressão < 25% (n=68)*			p27 Expressão ≥ 25% (n= 79)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	67	1,000	0,000	74	0,949	0,051
24	63	0,955	0,045	67	0,922	0,078
36	58	0,895	0,105	61	0,852	0,148
48	55	0,864	0,136	53	0,807	0,193
60	47	0,800	0,200	52	0,807	0,193
72	35	0,800	0,200	38	0,807	0,193
84	24	0,800	0,200	31	0,807	0,193
96	15	0,800	0,200	14	0,807	0,193
108	9	0,800	0,200	10	0,807	0,193
120	0	0,800	0,200	0	0,807	0,193
Valor de p (Log Rank)				0,947		
HR (Hazard Ratio)				1,026		
IC (95%)**				(0,482; 2,183)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

As curvas de sobrevivência à progressão para os dois grupos em análise apresentam uma sobreposição quase total como se observa no gráfico da figura 49.

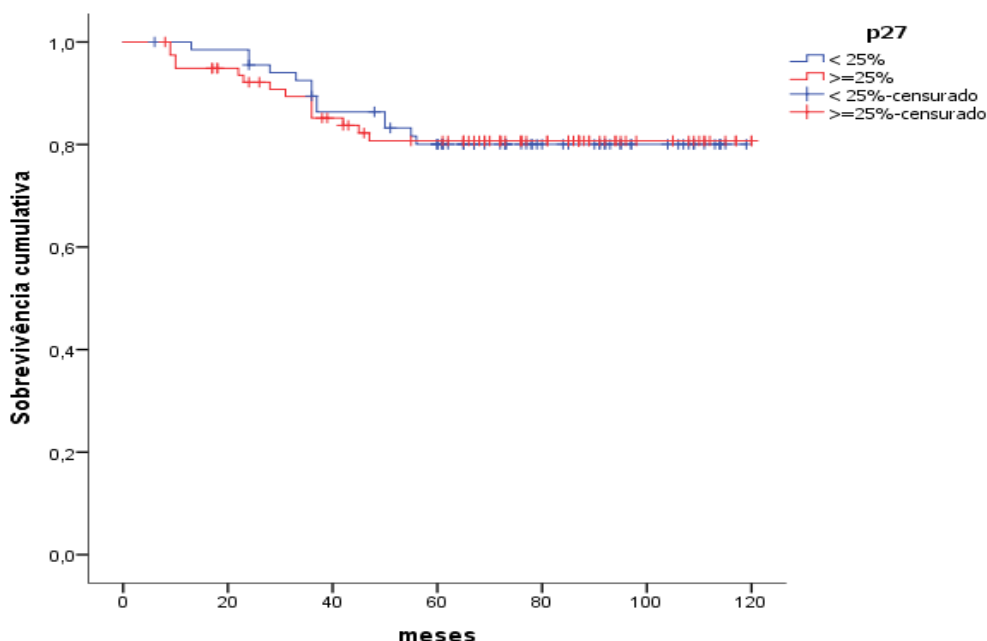


Figura 49 -Comparação entre curvas de sobrevivência à recorrência considerando a expressão de p27

5.6.3.5 - Ciclina D1

O resultado da influência da expressão da ciclina D1 no tempo até à recorrência (tabela 45 e figura 50), obtida através da análise de Kaplan Meier, mostra diferenças estatisticamente significativas ($p=0,002$) entre os grupos comparativos.

O grupo de doentes com expressão da ciclina $D1 \geq 25\%$ ($n= 15$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de progressão da doença de cerca de 50%, enquanto o grupo com expressão de ciclina $D1 < 25\%$ ($n=132$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 16% [$p=0,002$, *hazard ratio* de 3,54, IC 95% (1,490; 8,391)].

Estes resultados sugerem que uma expressão da ciclina $D1 \geq 25\%$ pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUB, com uma magnitude de 3,54 vezes.

Tabela 45 – Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D1 relativamente à progressão

Tempo (meses)	Ciclina D1 Expressão < 25% (n=132)*			Ciclina D1 Expressão ≥ 25% (n= 15)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	126	0,969	0,031	15	1,000	0,000
24	117	0,938	0,062	14	0,933	0,067
36	109	0,889	0,111	10	0,718	0,282
48	101	0,873	0,127	7	0,503	0,497
60	93	0,838	0,162	7	0,503	0,497
72	67	0,838	0,162	6	0,503	0,497
84	49	0,838	0,162	6	0,503	0,497
96	27	0,838	0,162	2	0,503	0,497
108	18	0,838	0,162	1	0,503	0,497
120	0	0,838	0,162	0	0,503	0,497
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,002		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				3,534		
IC (95%)**				(1,490; 8,381)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 50 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

A curva de sobrevivência cumulativa à progressão para o grupo com expressão da ciclina D1 < 25% apresenta uma descida lenta em contraste com a curva que representa o grupo com expressão da ciclina D1 ≥ 25% que praticamente atinge os 50%.

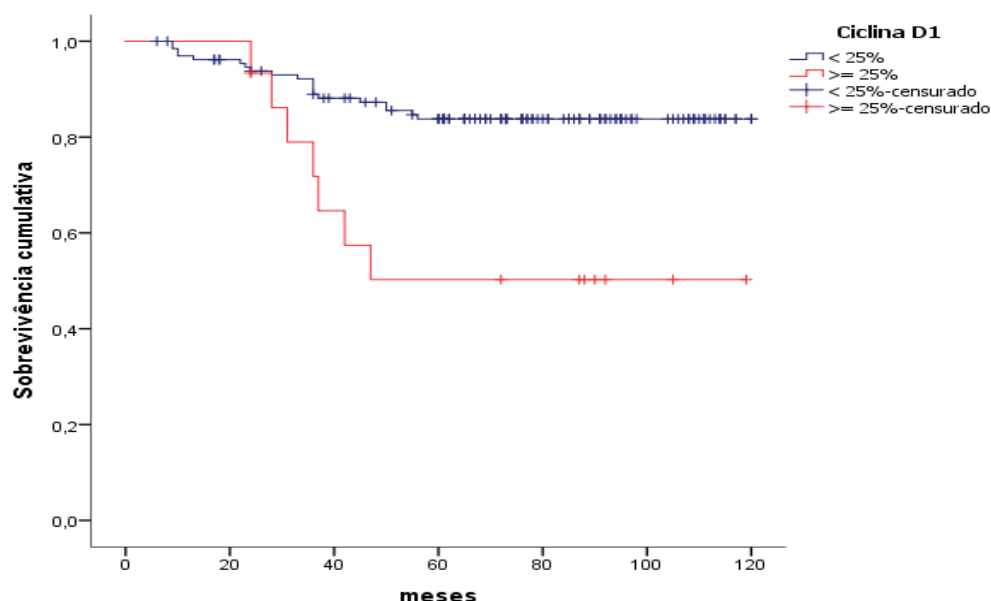


Figura 50 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão da ciclina D1

5.6.3.6 - Ciclina D3

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão da ciclina D3 no tempo até à progressão verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos (tabela 46).

O grupo de doentes com expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$ (n= 9) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de progressão da doença de cerca de 58%, enquanto o grupo com expressão de ciclina D1 $< 25\%$ (n=138) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de 17% [p<0,001, *hazard ratio* de 6,17, IC 95% (2,328; 16,372)].

Estes resultados sugerem que uma expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$ pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUB, com uma magnitude de 6 vezes.

Tabela 46 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D3 relativamente à progressão

Tempo (meses)	Ciclina D3 Expressão < 25% (n=138)*			Ciclina D3 Expressão ≥ 25% (n= 9)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	136	0,993	0,017	5	0,556	0,444
24	126	0,963	0,037	4	0,556	0,444
36	115	0,893	0,107	4	0,417	0,583
48	104	0,854	0,146	4	0,417	0,583
60	96	0.829	0,171	3	0,417	0,583
72	71	0.829	0,171	2	0,417	0,583
84	54	0.829	0,171	1	0,417	0,583
96	28	0.829	0,171	1	0,417	0,583
108	18	0.829	0,171	1	0,417	0,583
120	0	0.829	0,171	0	0,417	0,583
Tempo de sobrevivência mediano	-----			50 meses		
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				<0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				6,174		
IC (95%)**				(2,328; 16,372)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A curva de sobrevivência cumulativa à progressão para o grupo com expressão da ciclina D3 $< 25\%$ apresenta uma descida lenta contrastando com a curva que representa o grupo com expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$ que atinge os 50% com um tempo mediano de sobrevivência à progressão de 50 meses (figura 51).

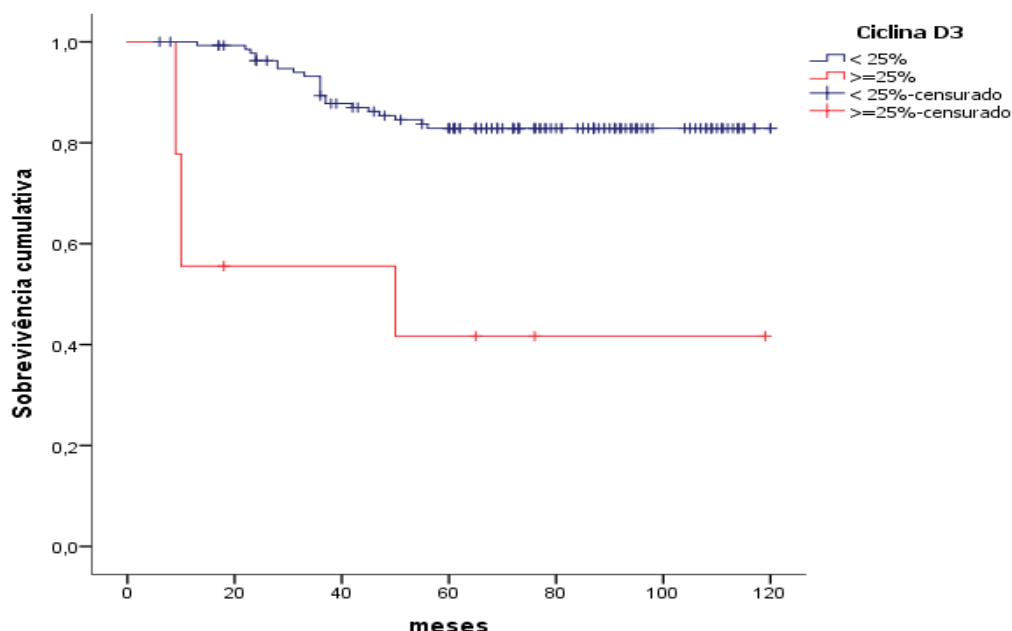


Figura 51 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão da ciclina D3.

5.6.3.7 - Bax

Relativamente à expressão de Bax nas células tumorais, como anteriormente, consideramos dois grupos de análise comparativa: os doentes com tumores com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Também, após a análise de Kaplan Meier sobre a influência do padrão de expressão do Bax no tempo até à progressão, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,017$) (tabela 47 e figura 52).

Os doentes sem expressão de Bax ($n=89$), apresentam uma proporção de incidência cumulativa de progressão da doença de 21% enquanto o grupo com expressão de Bax ($n=58$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 9,4% [$p=0,017$, *hazard ratio* de 0,326, IC 95% (0,123; 0,860)].

Estes resultados sugerem que a não expressão de Bax pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUNMIB, com uma magnitude acrescida de 3 vezes, ou seja, a expressão de Bax é um fator protetor com uma redução de *hazard* relativo de 67%.

Tabela 47 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à progressão

Tempo (meses)	Bax Sem expressão (n= 89)*			Bax Com expressão (n=58)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	84	0,966	0,054	57	0,983	0,017
24	77	0,919	0,081	53	0,965	0,035
36	69	0,823	0,177	50	0,946	0,054
48	63	0,787	0,213	45	0,906	0,094
60	57	0,737	0,213	42	0,906	0,094
72	41	0,737	0,213	32	0,906	0,094
84	31	0,737	0,213	24	0,906	0,094
96	13	0,737	0,213	16	0,906	0,094
108	8	0,737	0,213	11	0,906	0,094
120	0	0,737	0,213	0	0,906	0,094
Valor de p (Log Rank)				0,017		
HR (Hazard Ratio)				0,326		
IC (95%)**				(0,123; 0,860)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 51 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

A sobrevivência cumulativa à progressão tem uma descida pouco acentuada particularmente no grupo com expressão de Bax, ainda assim, nunca ultrapassando os 50% e como tal não existindo tempo mediano de sobrevivência.

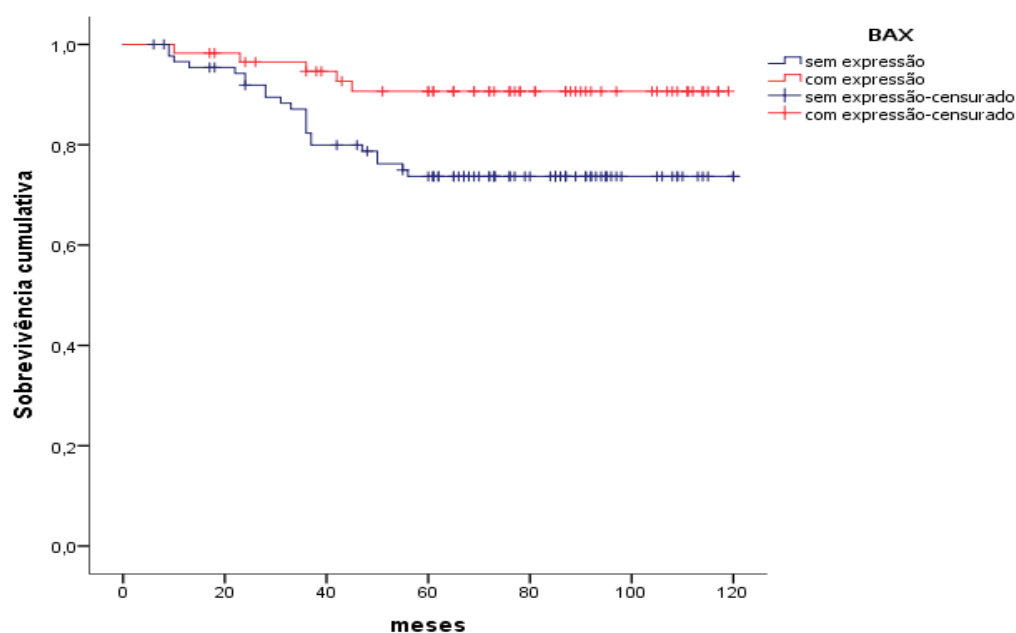


Figura 52 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de Bax.

5.6.3.8 - Bcl-2

Também para este biomarcador molecular consideramos dois grupos de análise comparativa: os doentes com tumores com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do padrão de expressão do Bcl-2 no tempo até à ocorrência de progressão, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,019$) (tabela 48 e figura 53).

Tabela 48 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bcl-2 relativamente à progressão

Tempo (meses)	Bcl-2 Sem expressão (n= 60)*			Bcl-2 Com expressão (n=87)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	54	0,931	0,069	86	1,000	0,000
24	49	0,878	0,122	81	0,976	0,024
36	43	0,788	0,212	76	0,928	0,072
48	39	0,751	0,249	69	0,890	0,110
60	36	0,713	0,287	63	0,864	0,156
72	26	0,713	0,287	47	0,864	0,156
84	19	0,713	0,287	36	0,864	0,156
96	10	0,713	0,287	19	0,864	0,156
108	6	0,713	0,287	13	0,864	0,156
120	0	0,713	0,287	0	0,864	0,156
Valor de p (Log Rank)				0,019		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,412		
IC (95%)**				(0,191; 0,888)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Nos doentes sem expressão de Bcl-2 (n=60), a proporção de incidência cumulativa de progressão da doença de 29% enquanto o grupo com expressão de Bcl-2 (n=87), apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 16% [$p=0,019$, *hazard ratio* de 0,412, IC 95% (0,191; 0,888)]

Estes resultados sugerem que a não expressão de Bcl-2 pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUNMIB, com uma magnitude de 2,5 vezes. A expressão de Bcl-2 é um fator protetor com uma redução de *hazard* relativo de 59%.

A curva de sobrevivência cumulativa à progressão tem uma descida pouco acentuada particularmente nos o grupo com expressão de Bcl-2, nunca atingindo os 50% e como tal não existindo tempo mediano de sobrevivência.

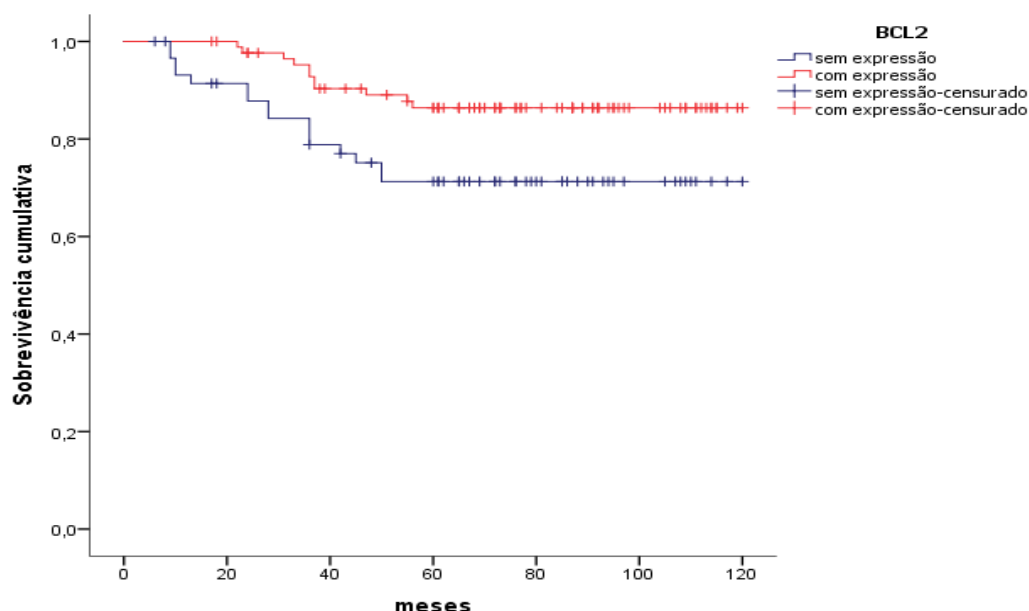


Figura 53 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de Bcl-2

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 53 evidenciam o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

5.6.3.9 - Caspase 3

Analisa-se a expressão da caspase 3 nas células tumorais considerando dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Na tabela 49 e na figura 54 observamos os resultados face à progressão tumoral da expressão diferencial das caspases. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos na análise de Kaplan Meier.

No entanto, apesar de não atingirem significado estatístico para $p < 0,05$ na análise de Kaplan-Meier, em termos meramente descritivos, os resultados mostram que o grupo de doentes sem expressão de caspases ($n=71$) a incidência cumulativa de recorrência é menor que para os doentes com expressão de caspases ($n=76$), respetivamente 15,5% e 24%, sugerindo que a expressão das caspases poderá aumentar o risco de progressão da doença.

Tabela 49 - Análise de Kaplan-Meier da expressão da caspase 3 relativamente à progressão

Tempo (meses)	Caspase 3 Sem expressão (n= 71)*			Caspase 3 Com expressão (n=76)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	77	0,973	0.027	68	0,971	0,029
24	69	0,946	0.054	61	0,927	0.073
36	64	0,905	0.085	55	0,836	0.164
48	56	0,860	0.140	52	0,806	0.194
60	53	0.845	0.155	46	0,759	0,241
72	38	0.845	0.155	35	0,759	0,241
84	32	0.845	0.155	23	0,759	0,241
96	18	0.845	0.155	11	0,759	0,241
108	12	0.845	0.155	7	0,759	0,241
120	0	0.845	0.155	0	0,759	0,241
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,213		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,619		
IC (95%)**				(0,287; 1,333)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Os resultados obtidos objetivam-se na observação das curvas de sobrevivência representadas no gráfico da figura 54.

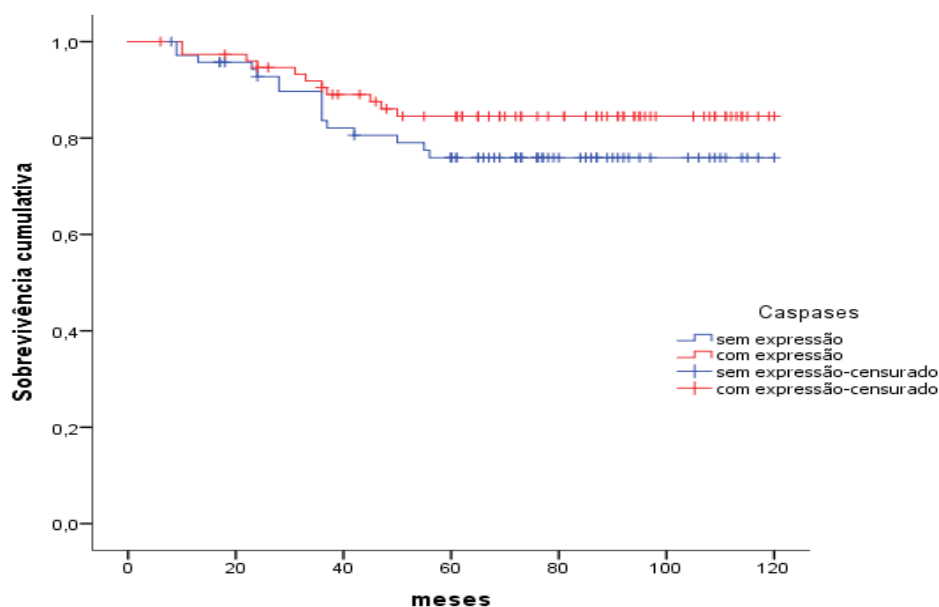


Figura 54 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com expressão de caspase 3 versus doentes sem expressão de caspase 3 face à progressão

5.6.3.10- CD 44

Para a análise da expressão do CD44, como anteriormente, consideramos dois grupos de análise comparativa: os doentes com tumores com expressão de CD44 e os doentes cujas células tumorais não expressam CD44.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão de CD44 no tempo até à progressão (tabela 50 e figura 55), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,672$) entre os grupos comparativos.

Tabela 50 -Análise de Kaplan-Meier da expressão de CD44 relativamente à progressão

Tempo (meses)	CD44 Sem expressão (n= 107)*			CD44 Com expressão (n=40)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	102	0,962	0,038	39	1,000	0,000
24	97	0,934	0,066	33	0,946	0,054
36	89	0,866	0,134	30	0,887	0,113
48	80	0,826	0,174	28	0,857	0,143
60	93	0,795	0,205	26	0,826	0,174
72	56	0,795	0,205	17	0,826	0,174
84	44	0,795	0,205	11	0,826	0,174
96	19	0,795	0,205	10	0,826	0,174
108	13	0,795	0,205	6	0,826	0,174
120	0	0,795	0,205	0	0,826	0,174
Valor de p (Log Rank)				0,673		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,823		
IC (95%)**				(0,332; 2,040)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Relativamente à incidência cumulativa de progressão da doença, o valor observado para ambos os grupos é equivalente, aspeto que se evidencia no gráfico da figura 47 em que as curvas de sobrevivência cumulativa à progressão são praticamente coincidentes.

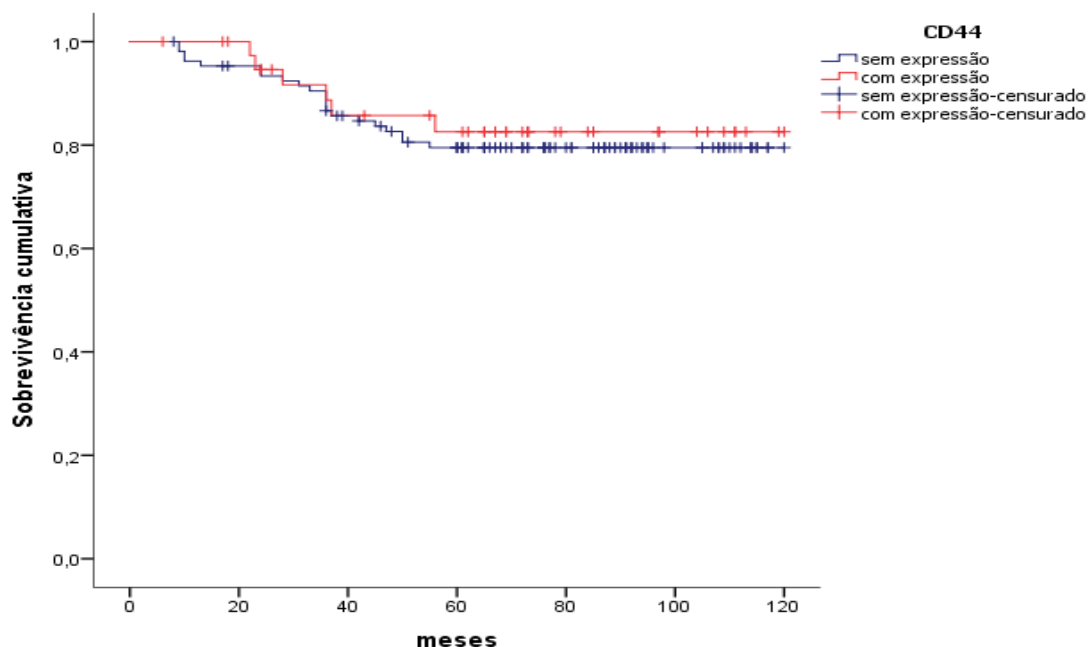


Figura 55 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de CD44.

5.6.3.11 - ErbB-2/HER2

Também na análise da expressão do biomarcador ErbB-2 nas células tumorais consideramos dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão do ErbB-2 no tempo até à progressão (tabela 51 e figura 56), encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,029$).

Nos doentes sem expressão de ErbB-2 ($n=43$), a incidência cumulativa de progressão da doença de 31%, enquanto o grupo com expressão de ErbB-2 ($n=104$), apresentam uma taxa de incidência cumulativa de 15% [$p=0,029$, *hazard ratio* de 0,443, IC 95% (0,208; 0,942)]

Estes resultados sugerem que a não expressão de ErbB-2 pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUNMIB, com uma magnitude de 2,5 vezes. A redução de *hazard* relativo de 56 % para os doentes com expressão de ErbB-2.

Tabela 51 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de ErbB-2 relativamente à progressão

Tempo (meses)	ErbB-2 Sem expressão (n= 43)*			ErbB-2 Com expressão (n=104)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	39	0,907	0,093	102	1,000	0,000
24	38	0,884	0,116	92	0,980	0,020
36	35	0,837	0,163	84	0,885	0,115
48	31	0,735	0,265	77	0,863	0,137
60	26	0,691	0,309	73	0,852	0,148
72	21	0,691	0,309	52	0,852	0,148
84	16	0,691	0,309	39	0,852	0,148
96	8	0,691	0,309	23	0,852	0,148
108	3	0,691	0,309	16	0,852	0,148
120	0	0,691	0,309	0	0,852	0,148
Valor de p (Log Rank)				0,029		
HR (Hazard Ratio)				0,443		
IC (95%)**				(0,208; 0,942)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 56 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

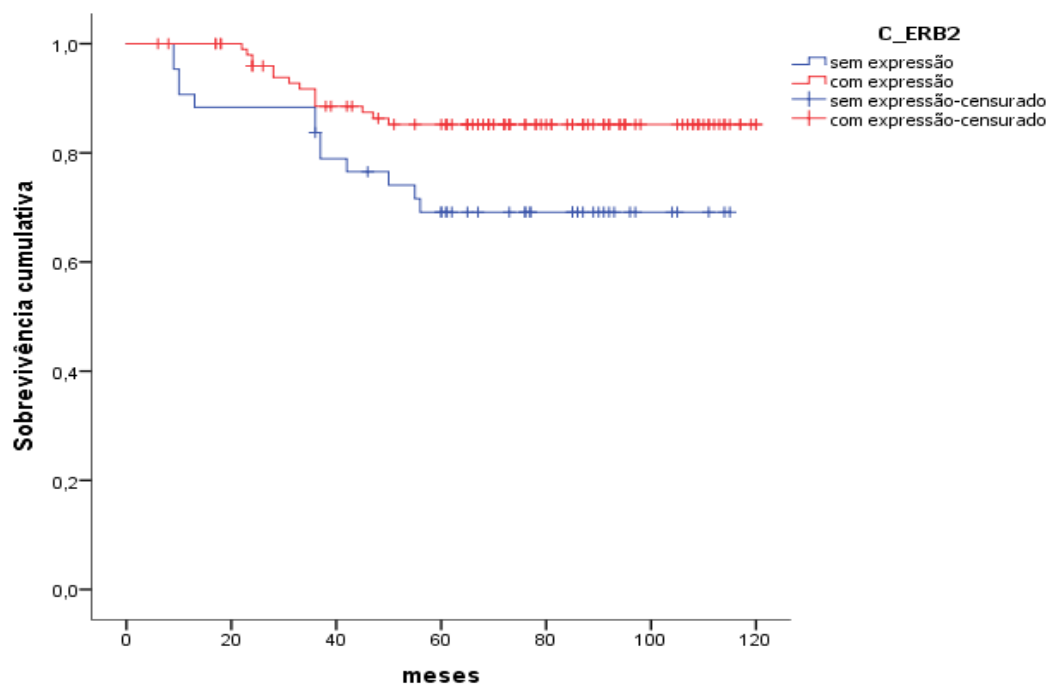


Figura 56 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de ErbB-2.

A curva de sobrevivência cumulativa à progressão tem uma descida pouco acentuada, particularmente no grupo com expressão de ErbB-2, ainda assim, nunca ultrapassando os 50% em ambos os grupos e como tal não existindo tempo mediano de sobrevivência.

5.6.3.12 - CK 5/6

Também na análise da expressão do biomarcador CK5/6 nas células tumorais consideramos dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão de CK5/6 no tempo até à progressão (tabela 52 e figura 57), não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,401$).

Tabela 52 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 5/6 relativamente à progressão

Tempo (meses)	CK 5/6 Sem expressão (n= 121)*			CK 5/6 Com expressão (n=26)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	116	0,967	0,033	25	1,000	0,000
24	108	0,933	0,067	22	0,957	0,043
36	99	0,872	0,128	20	0,870	0,130
48	93	0,854	0,146	15	0,729	0,271
60	84	0,817	0,183	11	0,729	0,271
72	65	0,817	0,183	8	0,729	0,271
84	48	0,817	0,183	7	0,729	0,271
96	25	0,817	0,183	4	0,729	0,271
108	18	0,817	0,183	1	0,729	0,271
120	0	0,817	0,183	0	0,729	0,271
Valor de p (Log Rank)				0,401		
HR (Hazard Ratio)				1,406		
IC (95%)**				(0,593; 3,643)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

No entanto, apesar de não atingirem significado estatístico para $p<0,05$ na análise de Kaplan-Meier, em termos descritivos, os resultados mostram que no grupo de doentes sem expressão de CK5/6 ($n=121$) a incidência cumulativa de recorrência é menor que para os doentes com expressão de CK5/6 ($n=26$), respetivamente 18% e 27%, sugerindo que a expressão de CK5/6 pelas células tumorais poderá aumentar o risco de progressão da doença.

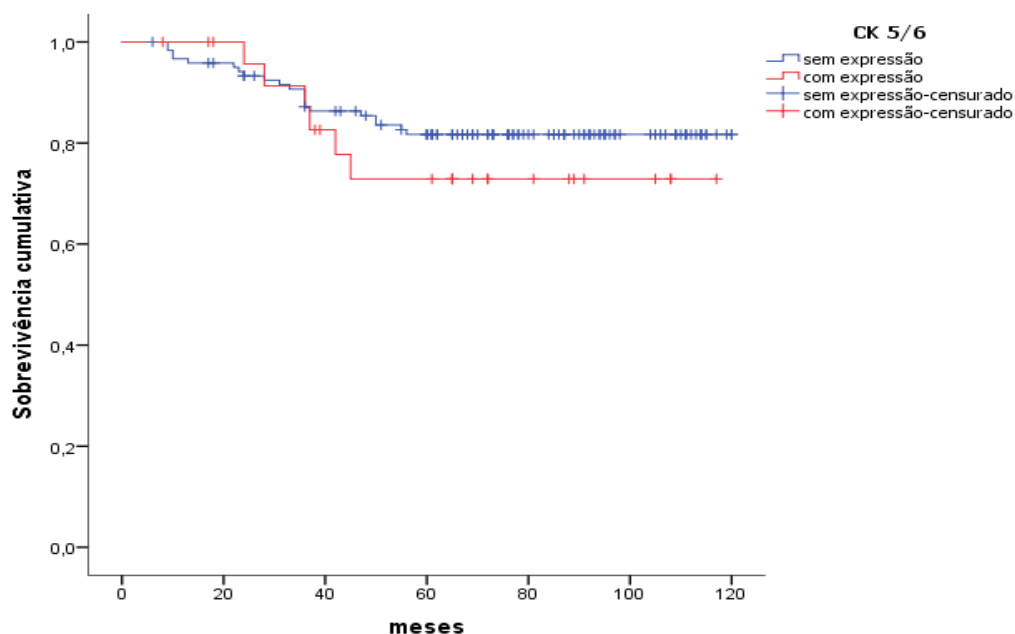


Figura 57 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de CK5/6.

5.6.3.13 - CK 20

No padrão de expressão de CK20 nas células tumorais consideramos dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Quando consideramos a influência da expressão de CK 20 no tempo até à progressão na análise de Kaplan Meier (tabela 53), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

A expressão do CK20 (n=38) nas células neoplásicas está associado a uma proporção de incidência cumulativa de progressão da doença de 37,5% enquanto o grupo dos doentes cujo tumor não expressa CK20 (n=109) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 13,7% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 3,46, IC 95% (1,623; 7,378)]. Estes resultados sugerem que a expressão de CK20 pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUBNMI, com uma magnitude acrescida de 3,4 vezes.

Tabela 53 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 20 relativamente à progressão

Tempo (meses)	CK 20 Sem expressão (n= 109)*			CK 20 Com expressão (n=38)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	107	1,000	0,000	34	0,895	0,105
24	102	0,981	0,019	28	0,811	0,189
36	95	0,923	0,077	24	0,721	0,279
48	89	0,904	0,016	19	0,625	0,375
60	82	0,863	0,137	18	0,625	0,375
72	61	0,863	0,137	12	0,625	0,375
84	45	0,863	0,137	10	0,625	0,375
96	22	0,863	0,137	7	0,625	0,375
108	16	0,863	0,137	3	0,625	0,375
120	0	0,863	0,137	0	0,625	0,375
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				3,461		
IC (95%)**				(1,623; 7,378)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 58 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

A curva de sobrevivência cumulativa à progressão para o grupo sem expressão de CK20 apresenta uma descida lenta em contraste com a curva que representa o grupo com expressão de CK20 que, ainda assim não atinge os 50%.

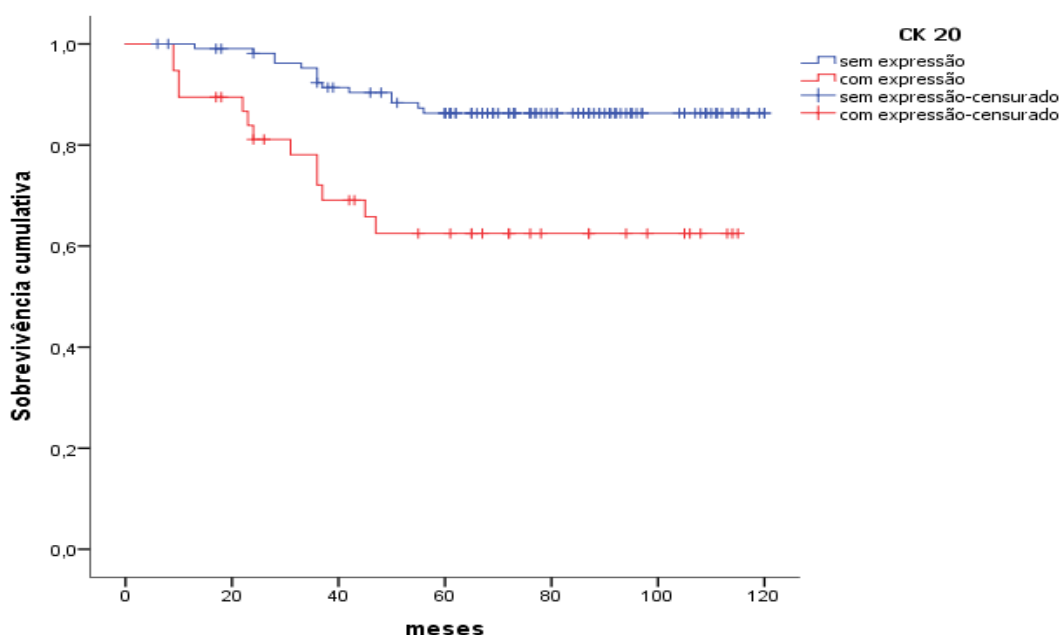


Figura 58 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando a expressão de CK20.

5.6.3.14 - Fenótipo Molecular

Como anteriormente referido, o fenótipo molecular para o CBUNMI tem por base um classificador molecular que utiliza a expressão de dois biomarcadores, o CK5/6 e o CK20, resultando em quatro fenótipos distintos: nulo,^(CK20-/CK5/6-) misto,^(CK20+/CK5/6+) basal^(CK20-/CK5/6+) e luminal.^(CK20+/CK5/6-)

Como podemos observar na tabela 54 e nas curvas de sobrevivência representadas no gráfico da figura 59, o resultado da análise de Kaplan Meier efetuada mostra diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos no tempo até à progressão ($p < 0,001$).

Nesta classificação do fenótipo molecular da CUNMIB o grupo comparador para a regressão de Cox é fenótipo nulo.^(CK20-/CK5/6-)

Os doentes com o fenótipo “luminal” ($n=32$) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de progressão da doença de 41,5% [$p=0,005$, *hazard ratio* de 2,15, IC 95% (1,189; 3,165)] enquanto os doentes com fenótipo “basal” ($n=20$) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de progressão da doença de 20,5% [$p=0,035$, *hazard ratio* de 3,24, IC 95% (1,085; 9,708)].

O resultado encontrado para o fenótipo “misto” não atingiu significado estatístico para $p < 0,05$, no entanto, em termos descritivos, observamos que a incidência cumulativa de progressão da doença no fenótipo “misto” ($n=6$) é de 12%, o mesmo valor encontrado para o fenótipo nulo que serve de categoria de referência para a análise

Como se pode observar no gráfico da figura 59, as curvas de sobrevivência à progressão para os diferentes fenótipos moleculares nulo e misto apresentam uma descida pouco acentuada. O fenótipo luminal apresenta a descida mais acentuada, ainda assim, nunca ultrapassando os 50% e como tal não existindo tempo mediano de sobrevivência.

Os fenótipos moleculares luminal e basal têm um riscos acrescido de progressão em comparação com o fenótipo molecular nulo, sendo estas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 54 - Análise de Kaplan-Meier da expressão fenotípica relativamente à progressão

Tempo (meses)	FENÓTIPO MOLECULAR											
	Nulo (n=89)*			Misto (n=6)			Basal (n=20)			Luminal (n=32)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	88	1,000	0,000	6	1,000	0,000	19	1,000	0,000	28	0,875	0,125
24	86	0,989	0,011	6	1,000	0,000	16	0,941	0,059	22	0,774	0,227
36	81	0,943	0,057	6	1,000	0,000	14	0,824	0,176	18	0,663	0,337
48	79	0,943	0,057	5	0,883	0,117	10	0,695	0,305	14	0,585	0,415
60	71	0,895	0,105	5	0,883	0,117	10	0,695	0,305	13	0,585	0,415
72	55	0,895	0,105	2	0,883	0,117	6	0,695	0,305	10	0,585	0,415
84	40	0,895	0,105	2	0,883	0,117	5	0,695	0,305	8	0,585	0,415
96	20	0,895	0,105	2	0,883	0,117	2	0,695	0,305	5	0,585	0,415
108	15	0,895	0,105	1	0,883	0,117	1	0,695	0,305	3	0,585	0,415
120	0	0,895	0,105	0	0,883	0,117	0	0,695	0,305	0	0,585	0,415
Valor de p (Log Rank)							<0.001					
HR (Hazard Ratio)				1,604			3,246			5,477		
IC (95%)**				(0,203; 12,661)			(1,085; 9,708)			(2,299; 13,051)		
Valor de p (Wald)				0,654			0,035			<0,001		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

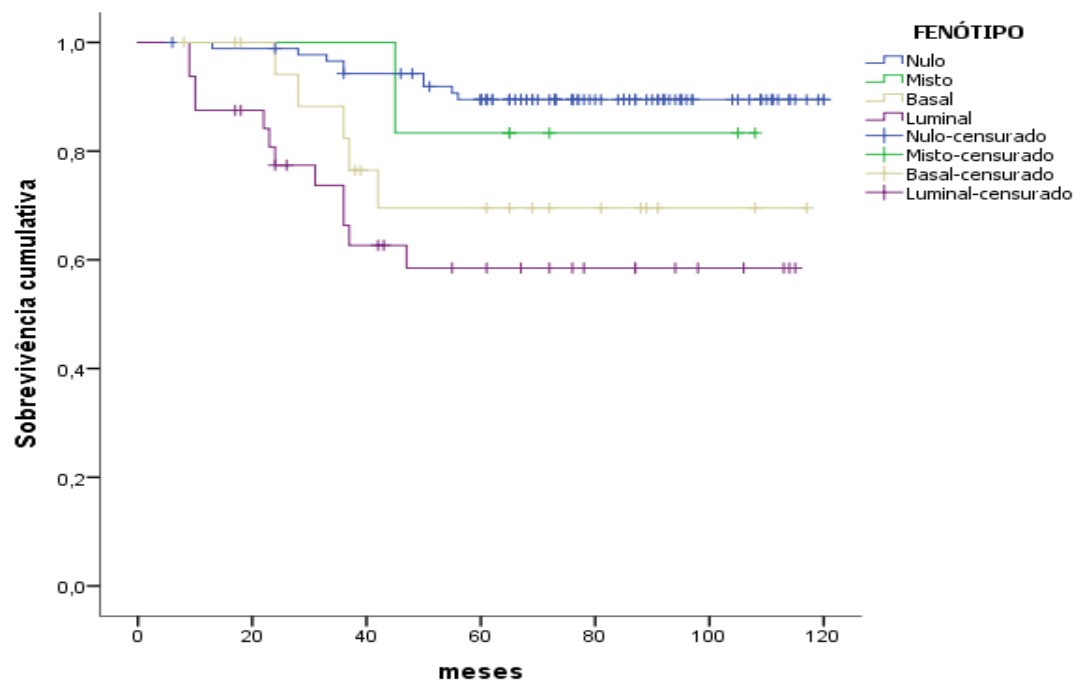


Figura 59 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à progressão considerando o Fenótipo molecular

5.6.4 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico nos resultados da progressão tumoral

Na tabela 55 apresentamos os resultados mais importantes da análise da influência dos fatores de prognóstico estudados relativamente à progressão da doença nos doentes estudados. Os fatores de prognóstico com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou próximo de significado estatístico ($p < 0,10$) estão destacados e constituem os fatores de prognóstico a integrar na análise multivariável.

Tabela 55 - Resumo da análise bivariável face à progressão tumoral

Variável (fator de prognóstico)	valor de p (Log Rank)	Hazard Ratio	IC 95%**
Idade (<70 anos* / ≥70 anos)	0,150	1,726	(0,811; 3,674)
Sexo (M*/F)	0,062	0,041	(0,000; 7,620)
D. tumor (< 3 cm* / ≥3 cm)	0,162	1,827	(0,772; 4,324)
Estádio (Ta*/T1)	<0,001	6,238	(2,851; 13,650)
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	7,853	(3,166; 19,481)
Ki67 (< 20%* / ≥ 20%)	0,006	2,987	(1,306; 6,830)
P53 (< 20% / ≥ 20%)	0,823	0,886	(0,306; 2,563)
P21 (< 5% / ≥ 5%)	0,226	1,735	(0,700; 4,298)
P27 (< 25% / ≥ 25%)	0,947	1,026	(0,482; 2,183)
Ciclina D1 (< 25%* / ≥ 25%)	0,002	3,534	(1,490; 8,381)
Ciclina D3 (< 25%* / ≥ 25%)	<0,001	6,174	(2,328; 16,372)
Caspases (sem expressão* / com expressão)	0,213	0,619	(0,287; 1,333)
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,017	0,326	(0,123; 0,860)
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	0,019	0,412	(0,191; 0,888)
CD44 (sem expressão* / com expressão)	0,673	0,823	(0,332; 2,040)
ErbB-2 (sem expressão* / com expressão)	0,029	0,443	(0,208; 0,942)
CK 5/6 (sem expressão* / com expressão)	0,401	1,406	(0,593; 3,643)
CK20 (sem expressão* / com expressão)	0,001	3,461	(1,623; 7,378)
Fenótipo (N*/M/B/L) ***	<0,001	--	--
Nulo			
Misto	0,654#	1,604	(0,203; 12,661)
Basal	0,035#	3,246	(1,085; 9,708)
Luminal	<0,001#	5,477	(2,299; 13,051)

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

*** Fenótipo: Nulo/Misto/ Basal/ Luminal

valor de p (Wald)

5.7 - Análise dos fatores de prognóstico nos resultados da morte específica

No próximo capítulo vamos proceder à análise dos resultados das variáveis de prognóstico face à morte específica, isto é, a causa direta da morte é a evolução da doença neoplásica. Também neste capítulo utilizaremos a análise de Kaplan Meier e a regressão de Cox para determinar o *hazard ratio* com o grupo *comparador*.

Como nos capítulos anteriores, iniciaremos a nossa análise pelas variáveis sociodemográficas seguidas das variáveis histopatológicas e finalmente pelos biomarcadores moleculares.

No final do capítulo apresentamos o resumo dos resultados relevantes com a indicação das variáveis que se revelaram estatisticamente significativas para $p < 0,05$ e as variáveis que serão integradas no modelo de análise multivariável de Cox.

5.7.1 - Análise dos fatores de prognóstico sociodemográficos nos resultados da morte específica

5.7.1.1 - Idade

Com anteriormente, consideramos dois subgrupos de análise: doentes com idade inferior a 70 anos e doentes com idade igual ou superior a 70 anos na altura do diagnóstico.

O resultado da análise de Kaplan Meier da influência da idade no tempo até à morte específica da doença (tabela 56 e figura 60), mostra a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Os doentes com idade ≥ 70 anos ($n=64$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de morte específica da doença de 21,8% enquanto os doentes com idade ≥ 70 anos ($n=83$) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de 9,4% [$p=0,013$, *hazard ratio* de 3,02, IC 95% (1,203; 7,576)].

Estes resultados sugerem que a idade ≥ 70 anos é um fator de risco para a morte específica da doença com uma magnitude de 3 vezes.

Tabela 56 - Análise de Kaplan-Meier da idade face à morte específica

Tempo (meses)	Idade < 70 anos (n=83)*			Idade ≥ 70 anos (n=64)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	82	1,000	0,000	62	1,000	0,000
24	81	1,000	0,000	52	0,918	0,082
36	78	0,988	0,012	50	0,882	0,118
48	76	0,962	0,038	41	0,824	0,176
60	71	0,937	0,063	38	0,804	0,196
72	48	0,906	0,094	31	0,782	0,218
84	35	0,906	0,094	25	0,782	0,218
96	17	0,906	0,094	14	0,782	0,218
108	13	0,906	0,094	8	0,782	0,218
120	0	0,906	0,094	0	0,782	0,218
Valor de p (Log Rank)				0,013		
HR (Hazard Ratio)				3,019		
IC (95%)**				(1,203; 7,576)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

As curvas de sobrevivência à morte específica para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

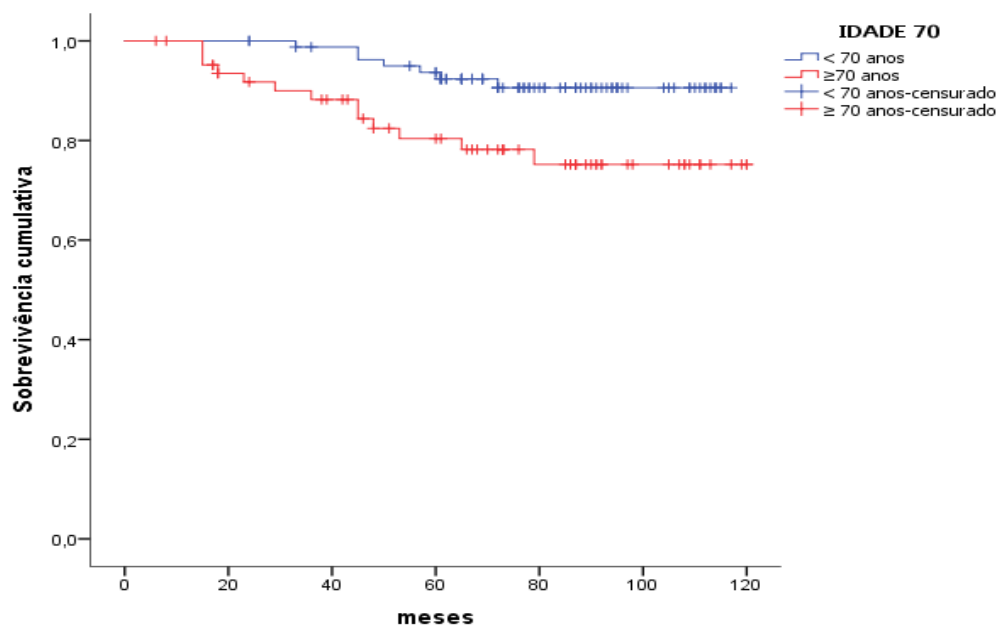


Figura 60 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com idade < 70 anos *versus* doentes com idade ≥ 70 anos face à morte específica

5.7.1.2 - Sexo

Na tabela 57 apresentamos os resultados da análise de sobrevivência (Kaplan Meier) para os dois géneros. Da análise de Kaplan Meier da influência do género no tempo até à morte específica não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,112$).

Salientamos que não foi registada qualquer caso de morte específica da doença nas mulheres durante o período de observação.

A proporção de incidência cumulativa da morte específica da doença nos homens foi de 17,6%, não ocorrendo após os 79 meses de observação.

Tabela 57 - Análise de Kaplan-Meier do sexo face à morte específica

Tempo (meses)	Masculino (n=130)*			Feminino (n=17)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	129	1,000	0,000	15	1,000	0,000
24	119	0,961	0,039	14	1,000	0,000
36	115	0,937	0,063	14	1,000	0,000
48	103	0,894	0,106	14	1,000	0,000
60	97	0,868	0,132	12	1,000	0,000
72	73	0,838	0,162	10	1,000	0,000
84	53	0,824	0,176	7	1,000	0,000
96	27	0,824	0,176	4	1,000	0,000
108	19	0,824	0,176	2	1,000	0,000
120	0	0,824	0,176	1	1,000	0,000
Valor de p (Log Rank)				0,112		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,042		
IC (95%)**				(0,000; 18,664)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Também em relação à influência do género no tempo até à morte específica, com se pode observar no gráfico da figura 61, as curvas de sobrevivência à morte específica para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

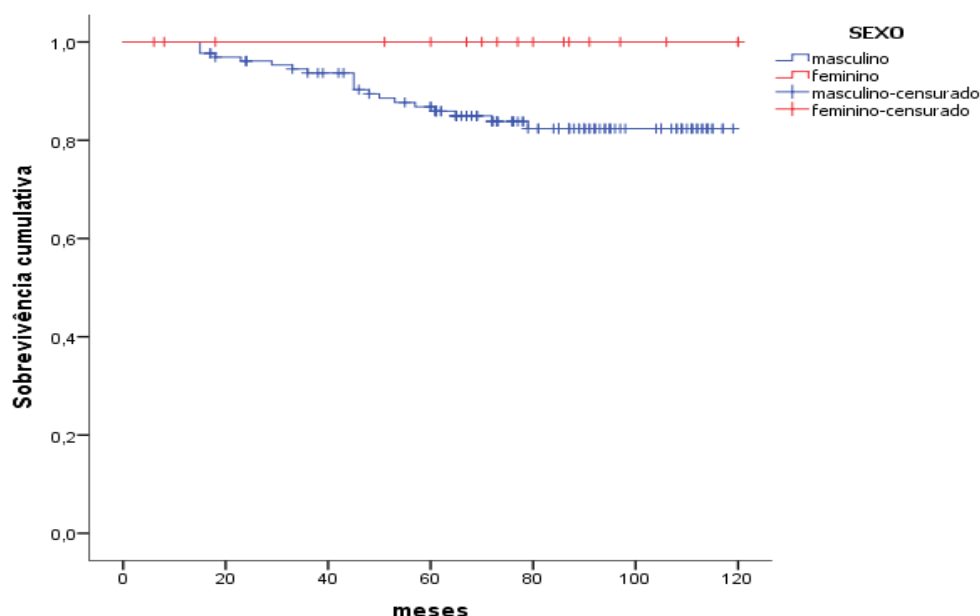


Figura 61 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do sexo masculino vs doentes do sexo feminino face à morte específica da doença

5.7.2 - Análise dos fatores de prognóstico clínico-patológicos nos resultados da morte específica

5.7.2.1 - Diâmetro tumoral

Como anteriormente, consideramos dois grupos de análise: doentes com tumor inferior a 3 centímetros e doentes com tumor maior ou igual a 3 centímetros.

A análise de Kaplan Meier sobre a influência da dimensão do tumor vesical observado no tempo até à morte específica da doença (tabela 58 e figura 62), mostra a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p=0,028$) entre os grupos comparativos.

Os doentes nos quais se verificou uma dimensão do tumor ≥ 3 cm apresentam inferior sobrevivência com uma taxa de incidência cumulativa da morte específica pela doença de 21% enquanto de doentes com tumor < 3 cm apresenta uma taxa de incidência cumulativa de 6,4% [$p=0,028$, *hazard ratio* de 3,62, IC 95% (1,060; 12,355)]. Estes resultados sugerem que uma dimensão do tumor ≥ 3 cm é um fator de risco para a morte específica pela doença com uma magnitude acrescida de 3,6 vezes.

Tabela 58 - Análise de Kaplan-Meier do diâmetro tumoral face à morte específica

Tempo (meses)	Tumor < 3 cm (n=51)*			Tumor ≥ 3 cm (n=96)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	50	1,000	0,000	94	1,000	0,000
24	50	1,000	0,000	82	0,946	0,054
36	50	1,000	0,000	78	0,911	0,089
48	48	0,980	0,020	69	0,862	0,138
60	44	0,959	0,041	65	0,837	0,163
72	30	0,936	0,064	49	0,808	0,192
84	25	0,936	0,064	35	0,789	0,211
96	12	0,936	0,064	19	0,789	0,211
108	7	0,936	0,064	14	0,789	0,211
120	0	0,936	0,064	0	0,789	0,211
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,028		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				3,619		
IC (95%)**				(1,060; 12,355)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

As curvas de sobrevivência à morte específica para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

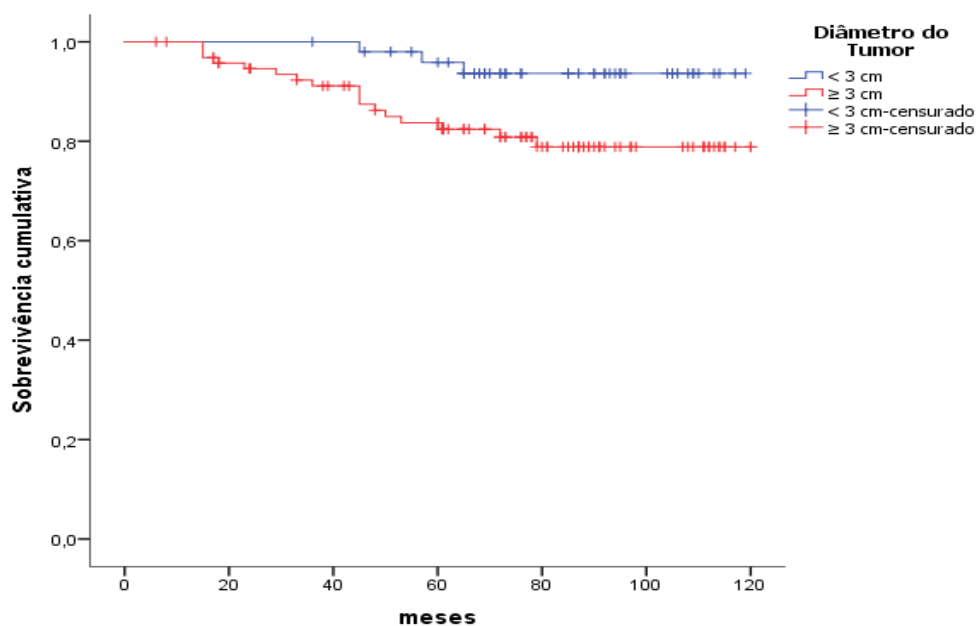


Figura 62 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a dimensão tumoral

5.7.2.2 - Estádio

Na tabela 59 e figura 63 apresentamos os valores da análise de Kaplan-Meier do estágio tumoral (Classificação OMS 2016) relativamente à morte específica da doença. Como anteriormente, consideramos dos grupos, os doentes com Ta e os doentes com T1 relativamente à ocorrência de morte específica pelo tumor.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do estágio (Ta, T1) no tempo até à morte específica verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p < 0,001$).

Os doentes com T1 apresentam uma proporção de incidência cumulativa de morte específica pela doença de 40% enquanto os doentes com Ta apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 7,1% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 6,15, IC 95% (2,453; 15,43)]. Estes resultados sugerem que o estágio T1 é um fator de risco para a morte específica pela doença, com uma magnitude de 6 vezes quando comparado com o estágio Ta.

Tabela 59 -Análise de Kaplan-Meier do estágio face à morte específica

Tempo (meses)	Ta (n=110)*			T1 (n=37)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	109	1,000	0,000	36	1,000	0,000
24	101	0,982	0,018	32	0,916	0,084
36	97	0,962	0,038	31	0,887	0,113
48	91	0,952	0,048	26	0,769	0,231
60	85	0,941	0,059	24	0,710	0,290
72	63	0,929	0,071	16	0,642	0,338
84	48	0,929	0,071	12	0,597	0,403
96	25	0,929	0,071	6	0,597	0,403
108	17	0,929	0,071	4	0,597	0,403
120	0	0,929	0,071	0	0,597	0,403
Valor de p (Log Rank)				<0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				6,151		
IC (95%)*				(2,453; 15,427)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

As curvas de sobrevivência à morte específica da doença para ambos os grupos nunca ultrapassando os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

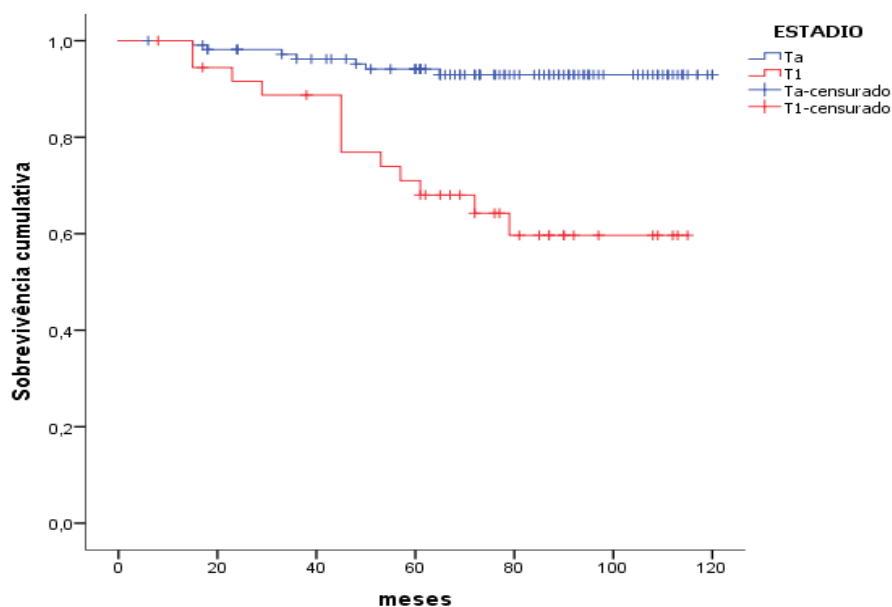


Figura 63 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com estágio Ta versus T1 face à morte específica.

5.7.2.3 - Grau histológico

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do grau histológico observada no tempo até à morte específica pela doença (tabela 60 e figura 64) verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p < 0,001$).

Tabela 60 - Análise de Kaplan-Meier do grau histológico relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Baixo Grau (n=95)*			Alto Grau (n=52)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	94	1,000	0,000	51	1,000	0,000
24	91	1,000	0,000	44	0,901	0,099
36	85	0,977	0,023	43	0,880	0,120
48	81	0,977	0,023	36	0,773	0,223
60	75	0,965	0,035	34	0,730	0,270
72	55	0,952	0,048	24	0,681	0,319
84	40	0,952	0,048	20	0,650	0,350
96	22	0,952	0,048	9	0,650	0,350
108	15	0,952	0,048	6	0,650	0,350
120	0	0,952	0,048	0	0,650	0,350
Valor de p (Log Rank)				<0,001		
HR (Hazard Ratio)				8,263		
IC (95%)**				(2,762; 24,725)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Os doentes com tumor de alto grau apresentam uma proporção de incidência cumulativa de morte específica da doença de 35% enquanto os doentes com tumor de baixo grau apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 4,8% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 8,26, IC 95% (2,76; 24,73)].

Estes resultados sugerem que o alto grau histológico é um fator de risco para a progressão do CUB, com uma magnitude de 8 vezes quando comparado com os tumores de baixo grau. As curvas de sobrevivência à morte específica da doença para ambos os grupos nunca ultrapassam os 50% e como tal não existe tempo mediano de sobrevivência.

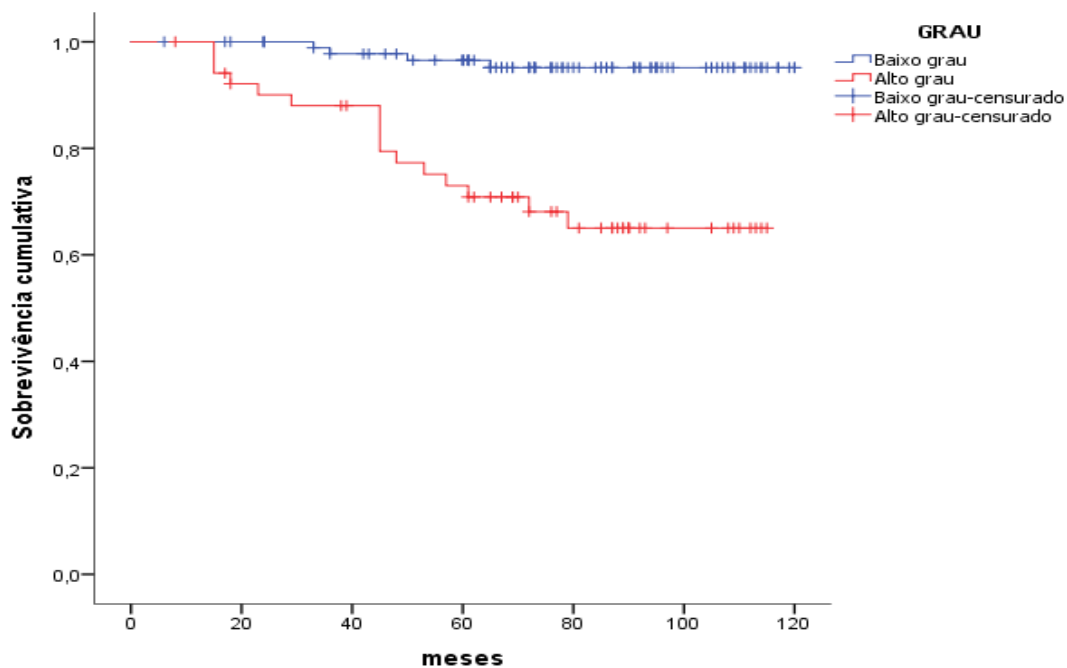


Figura 64 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com tumores de alto grau versus doente com tumor de baixo grau histológico relativamente à morte específica

5.7.3 - Análise da expressão dos biomarcadores moleculares nos resultados da morte específica

5.7.3.1 - Ki-67

Relativamente à expressão de Ki-67, tendo em conta as duas categorias consideradas, a análise de Kaplan-Meier sobre a influência da expressão de Ki-67 observada no tempo até à morte específica (tabela 61), mostra a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

Os doentes com expressão de Ki-67 $\geq 20\%$ (n= 22) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de recorrência da doença de 29% enquanto os doentes com expressão de Ki-67 $< 20\%$ (n= 125) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de 13,5% [p=0,025, *hazard ratio* de 2,845, IC 95% (1,092; 7,411)].

Tabela 61 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ki-67 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Ki-67 Expressão < 20% (n=125)*			Ki-67 Expressão $\geq 20\%$ (n= 22)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	123	1,000	0,000	21	1,000	0,000
24	116	0,984	0,016	17	0,864	0,136
36	112	0,967	0,037	16	0,813	0,207
48	102	0,931	0,069	15	0,762	0,238
60	95	0,912	0,088	14	0,711	0,289
72	70	0,880	0,120	9	0,711	0,289
84	52	0,865	0,135	8	0,711	0,289
96	26	0,865	0,135	5	0,711	0,289
108	17	0,865	0,135	4	0,711	0,289
120	0	0,865	0,135	0	0,711	0,289
Valor de p (Log Rank)				0,025		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				2,845		
IC (95%)**				(1,092; 7,411)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Como se pode observar na figura 65, as curvas de sobrevivência à morte específica para ambos os grupos apresentam uma descida pouco acentuada sem atingir os 50%, portanto, não se definindo tempo mediano de sobrevivência.

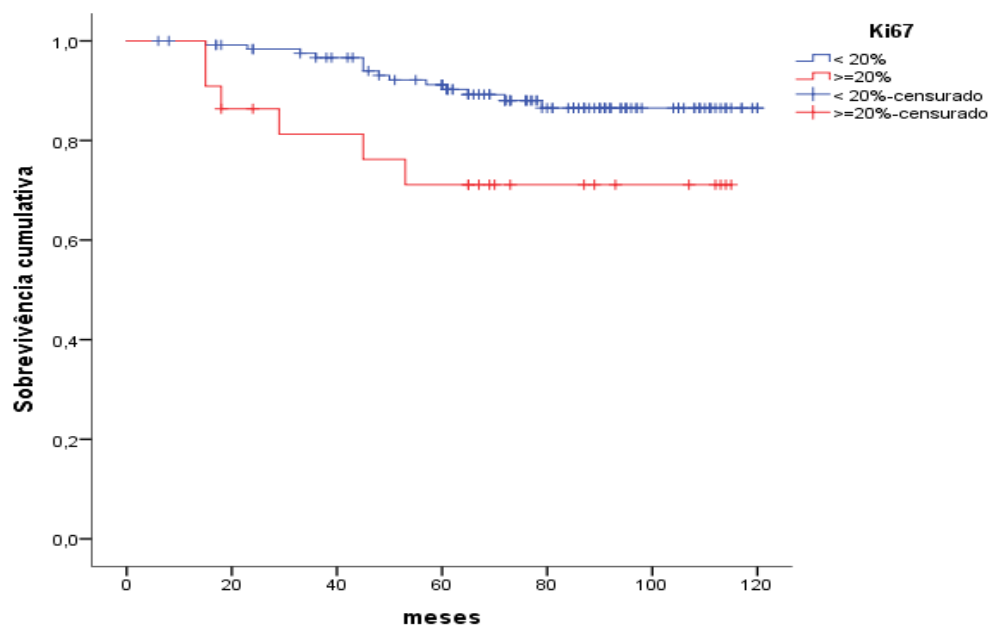


Figura 65 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão do Ki-67

5.7.3.2 - p53

Os resultados da análise de Kaplan Meier, considerando a expressão de p53 nas células tumorais, utilizando o valor de *cutoff* de 20%, estão representados na tabela 62 e no gráfico da figura 66.

Da análise da influência da expressão de p53 no tempo até à morte específica não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,843$).

Também, relativamente à incidência cumulativa da morte específica da doença, o valor observado é semelhante para os dois grupos, situando-se nos 16% e 14% respetivamente para o grupo dos doentes com tumores com expressão de p53 < 20% e para os doentes cujas células tumorais expressam o p53 acima dos 20%.

Tabela 62 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p53 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	p53 Expressão < 20% (n=123)*			p53 Expressão ≥ 20% (n= 24)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	121	1,000	0,000	24	1,000	0,000
24	112	0,967	0,033	21	0,958	0,042
36	107	0,941	0,059	21	0,958	0,042
48	98	0,905	0,095	19	0,910	0,090
60	90	0,877	0,133	19	0,910	0,090
72	66	0,854	0,146	14	0,863	0,137
84	48	0,838	0,162	12	0,863	0,137
96	24	0,838	0,162	7	0,863	0,137
108	15	0,838	0,162	6	0,863	0,137
120	0	0,838	0,162	0	0,863	0,137
Valor de p (Log Rank)				0,843		
HR (Hazard Ratio)				0,884		
IC (95%)**				(0,259; 3,017)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Como podemos observar no gráfico da figura 59 as curvas de sobrevivência à morte específica são praticamente sobreponíveis objetivando a inexistência de diferenças estatisticamente significativas na comparação dos dois grupos em análise.

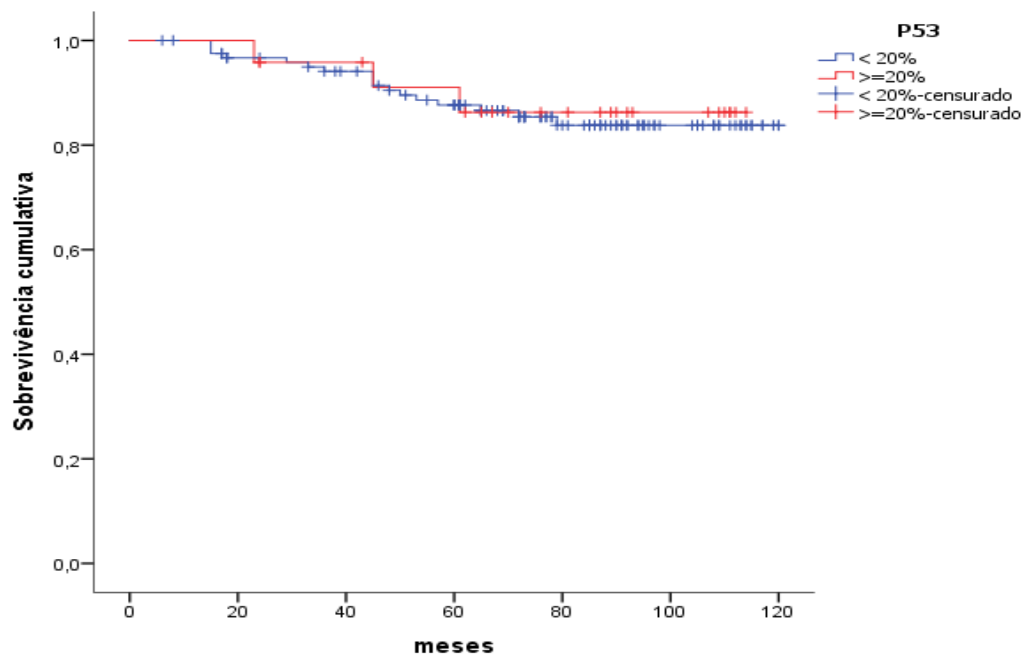


Figura 66 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes face à morte específica considerando a expressão do p53.

5.7.3.3 - p21

Como anteriormente, para a análise da expressão de p21 consideramos dois grupos: os doentes com tumores com expressão de p21<5% e os doentes cujas células tumorais expressam p21 acima dos 5%.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,261$) na análise de Kaplan Meier da influência da expressão de p21 no tempo até à morte específica ($p=0,261$) (tabela 63 e figura 67).

Relativamente à incidência cumulativa da morte específica da doença, o valor observado é de 18% para o grupo cuja expressão de p21 ($n=100$) é mais elevada e de 10% para o grupo com expressão de p21<5%, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

Tabela 63 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p21 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	p21 Expressão < 5% ($n=47$)*			p21 Expressão \geq 5% ($n= 100$)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	46	1,000	0,000	99	1,000	0,000
24	44	1,000	0,000	89	0,949	0,051
36	42	0,977	0,023	86	0,928	0,072
48	35	0,926	0,074	82	0,895	0,105
60	34	0,926	0,074	75	0,862	0,138
72	25	0,898	0,102	55	0,836	0,164
84	20	0,898	0,102	40	0,817	0,183
96	8	0,898	0,102	23	0,817	0,183
108	6	0,898	0,102	15	0,817	0,183
120	0	0,898	0,102	0	0,817	0,183
Valor de p (Log Rank)				0,261		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				1,852		
Intervalo de Confiança (95%)**				(0,619; 5,539)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A expressão gráfica do comportamento das curvas de sobrevivência à morte específica pode ser observada na figura 67, salientando-se uma descida pouco acentuada em ambos os grupos comparativos.

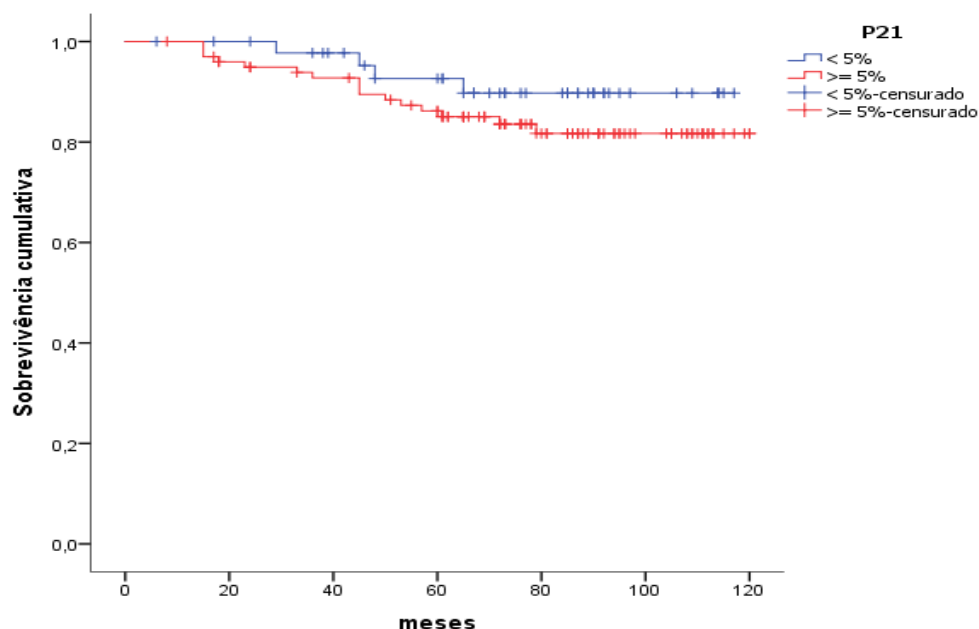


Figura 67 - Comparação entre curvas de sobrevivência à morte específica considerando a expressão de p21.

5.7.3.4 - p27

Considerando a expressão de p27, conforme anteriormente referido, os doentes foram divididos em dois grupos comparativos utilizando um valor de *cutoff* de 25%.

Tabela 64 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do p27 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	p27 Expressão < 25% (n=68)*			p27 Expressão ≥ 25% (n= 79)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	67	1,000	0,000	78	1,000	0,000
24	66	1,000	0,000	67	0,935	0,065
36	62	0,970	0,030	66	0,921	0,079
48	58	0,923	0,074	59	0,891	0,119
60	53	0,891	0,109	55	0,860	0,140
72	37	0,849	0,151	42	0,860	0,140
84	26	0,849	0,151	34	0,837	0,163
96	15	0,849	0,151	16	0,837	0,163
108	9	0,849	0,151	12	0,837	0,163
120	0	0,849	0,151	0	0,837	0,163
Valor de p (Log Rank)				0,771		
HR (Hazard Ratio)				1,139		
IC (95%)**				(0,472; 2,750)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

O resultado da análise de sobrevivência à morte específica não mostra diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos (valor de $p=0,771$ no teste de *Log Rank* na análise de Kaplan Meier) com se pode observar na tabela 64.

Como podemos observar no gráfico da figura 68 as curvas de sobrevivência à morte específica são praticamente sobreponíveis e com uma descida pouco acentuada, objetivando a inexistência de diferenças estatisticamente significativas na comparação dos dois grupos em análise.

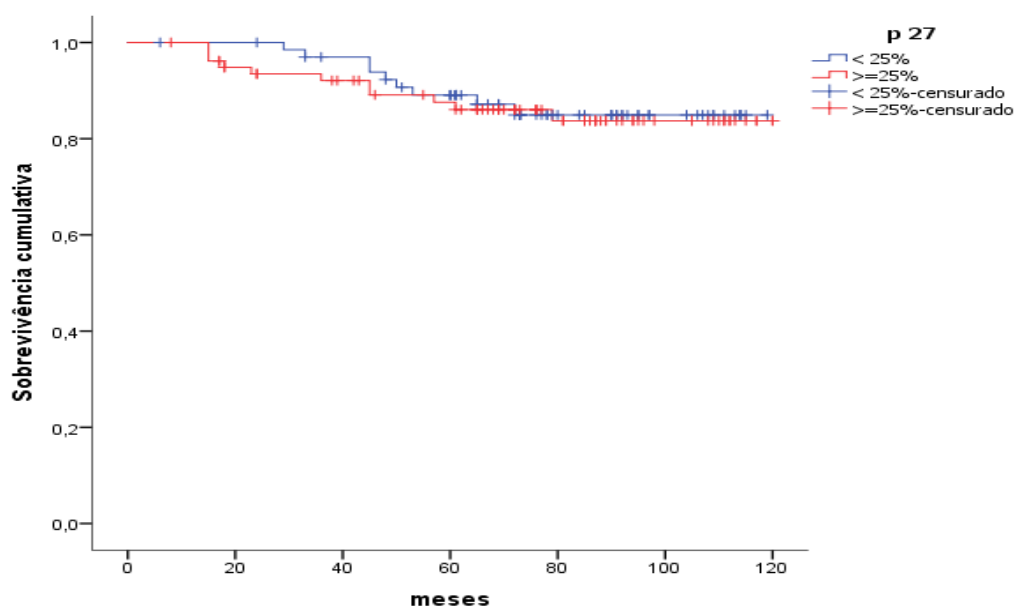


Figura 68 - Comparação entre curvas de sobrevivência à morte específica considerando a expressão de p27.

5.7.3.5 - Ciclina D1

A análise de sobrevivência à morte específica pelo método de Kaplan-Meier, utilizando um *cutoff* de 25% na expressão da ciclina D1 pelas células tumorais, verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos (tabela 65).

O grupo de doentes com expressão da ciclina D1 $\geq 25\%$ ($n= 15$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de morte específica da doença de cerca de 45%, enquanto o grupo com expressão de ciclina D1 $<25\%$ ($n=132$) apresentam proporção de incidência cumulativa de 12% [$p=0,003$, *hazard ratio* de 3,86, IC 95% (1,461; 9,913)]. Estes resultados sugerem que uma expressão da ciclina D1 $\geq 25\%$ pelas células

tumorais é um fator de risco para a morte específica do CUBNMI, com uma magnitude de 3,86 vezes.

Tabela 65 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D1 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Ciclina D1 Expressão < 25% (n=132)*			Ciclina D1 Expressão ≥ 25% (n= 15)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	130	1,000	0,000	15	1,000	0,000
24	119	0,961	0,039	14	1,000	0,000
36	115	0,945	0,055	13	0,929	0,071
48	107	0,928	0,072	10	0,714	0,286
60	99	0,912	0,088	10	0,714	0,286
72	71	0,880	0,120	8	0,643	0,357
84	53	0,880	0,120	7	0,563	0,447
96	28	0,880	0,120	3	0,563	0,447
108	19	0,880	0,120	3	0,563	0,447
120	0	0,880	0,120	0	0,563	0,447
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,003		
HR (Hazard Ratio)				3,806		
IC (95%)**				(1,461; 9,913)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 69 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

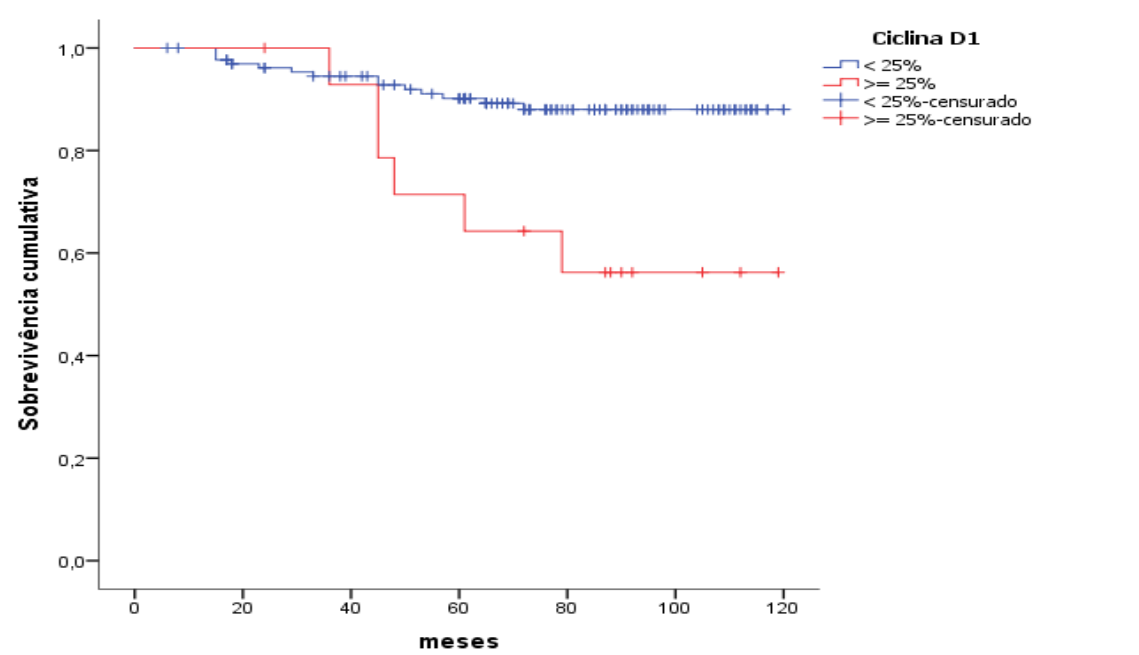


Figura 69 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão da ciclina D1

5.7.3.6 - Ciclina D3

Como já descrito anteriormente utilizamos um *cutoff* de 25% na expressão da ciclina D3 pelas células tumorais, constituindo dois grupos comparativos de análise.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência da expressão da ciclina D3 no tempo até à progressão verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos (tabela 66).

O grupo de doentes com expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$ (n= 9) apresentam uma incidência cumulativa de progressão da doença de cerca de 44%, enquanto o grupo com expressão de ciclina D1 $<25\%$ (n=138) apresentam uma incidência cumulativa de 17% [$p < 0,001$, *hazard ratio* de 6,71, IC 95% (2,221; 20,252)].

Estes resultados sugerem que uma expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$ pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUB, com uma magnitude de 6,7 vezes.

Tabela 66 - Análise de Kaplan-Meier da expressão do Ciclina D3 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Ciclina D3 Expressão < 25% (n=138)*			Ciclina D3 Expressão $\geq 25\%$ (n= 9)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	136	1,000	0,000	8	1,000	0,000
24	129	0,992	0,037	4	0,556	0,444
36	124	0,969	0,107	4	0,556	0,444
48	113	0,929	0,146	4	0,556	0,444
60	105	0,904	0,171	4	0,556	0,444
72	77	0,875	0,171	2	0,556	0,444
84	59	0,862	0,171	1	0,556	0,444
96	30	0,862	0,171	1	0,556	0,444
108	20	0,862	0,171	1	0,556	0,444
120	0	0,862	0,171	0	0,556	0,444
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				<0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				6,706		
IC (95%)**				(2,221; 20,252)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 70 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier: a curva de sobrevivência cumulativa à morte específica para o grupo com expressão da ciclina D3 $<25\%$ apresenta uma descida lenta em contraste com a curva que representa o grupo com expressão da ciclina D3 $\geq 25\%$ que atinge os 44%.

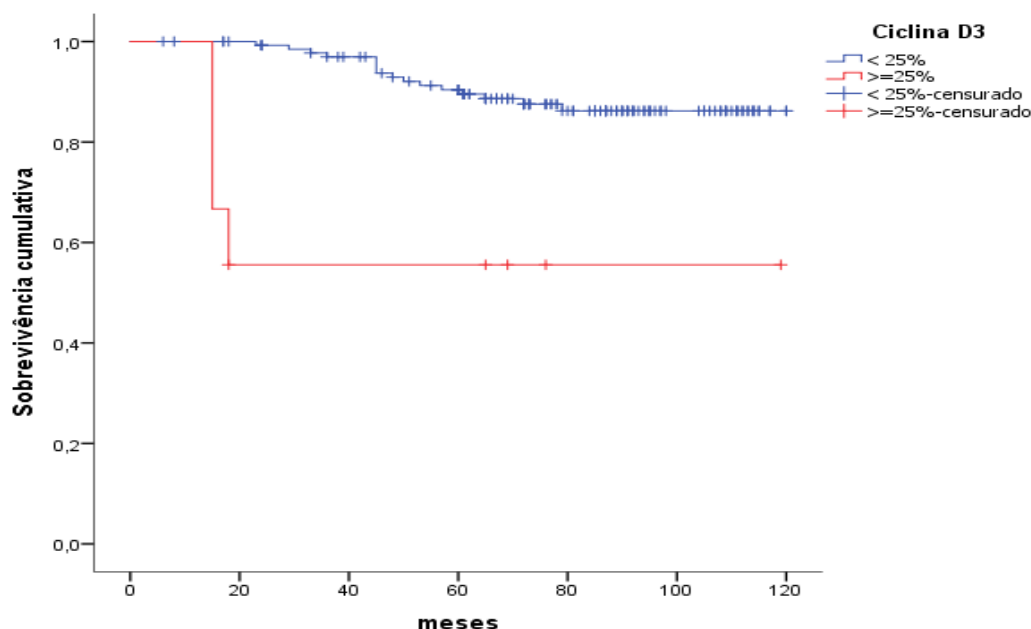


Figura 70 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão da ciclina D3

5.7.3.7 - Bax

Relativamente à expressão de Bax nas células tumorais, seguindo a metodologia já descrita, consideram-se dois grupos de análise comparativa: os doentes com tumores com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Também, após a análise de Kaplan Meier sobre a influência do padrão de expressão de Bax no tempo até à morte específica, verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,019$) (tabela 67 e figura 71).

Os doentes sem expressão de Bax ($n=89$), apresentam uma incidência cumulativa de morte específica da doença de 22% enquanto o grupo com expressão de Bax ($n=58$) apresentam uma incidência cumulativa de 6,4% [$p=0,019$, *hazard ratio* de 0,257, IC 95%(0,075; 0,877)].

Estes resultados sugerem que a não expressão de Bax pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUNMIB, com uma magnitude acrescida de 4 vezes. A expressão de Bax pelas células tumorais é um fator de proteção de morte específica com uma redução de *hazard* relativo de 74%.

Tabela 67 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Bax Sem expressão (n= 89)*			Bax Com expressão (n=58)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	87	1,000	0,000	57	1,000	0,000
24	80	0,954	0,046	53	0,982	0,018
36	76	0,918	0,082	52	0,982	0,018
48	69	0,869	0,131	48	0,962	0,038
60	64	0,831	0,169	45	0,962	0,038
72	45	0,804	0,196	34	0,936	0,064
84	34	0,783	0,217	26	0,936	0,064
96	13	0,783	0,217	18	0,936	0,064
108	8	0,783	0,217	13	0,936	0,064
120	0	0,783	0,217	0	0,936	0,064
Valor de <i>p</i> (Log Rank)				0,019		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,257		
IC (95%)*				(0,075; 0,877)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

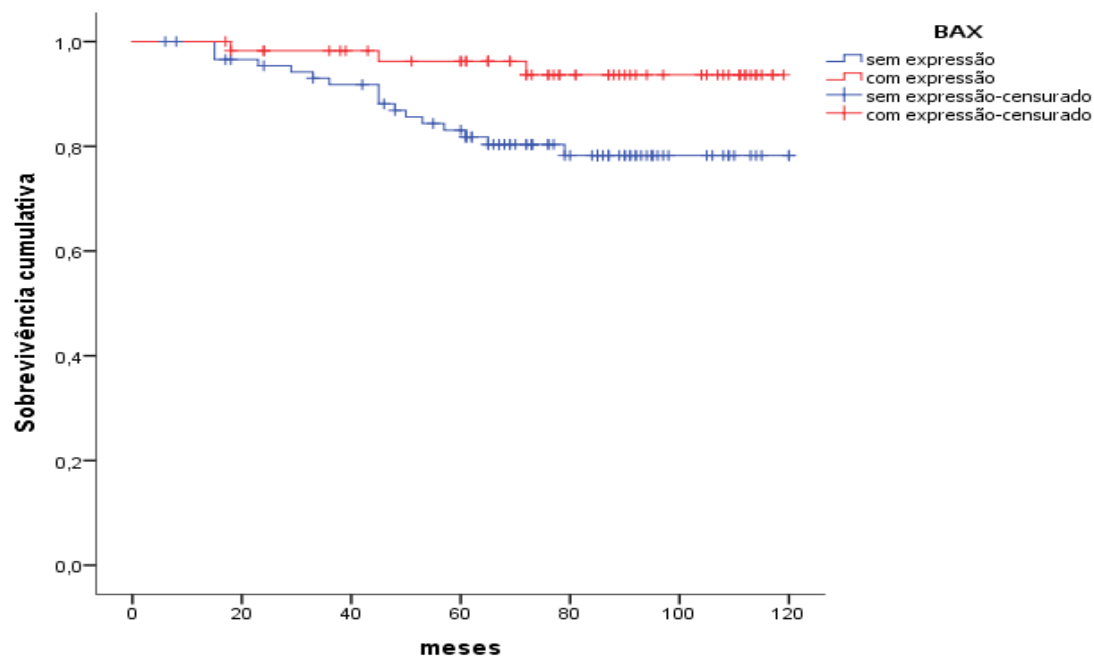


Figura 71 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bax relativamente à morte específica

5.7.3.8 - Bcl-2

Também para este biomarcador molecular consideramos dois grupos de análise comparativa: os doentes com tumores com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier sobre a influência do padrão de expressão do Bcl-2 no tempo até à ocorrência de morte específica pela doença, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,014$) (tabela 68 e figura 72).

Nos doentes sem expressão de Bcl-2 ($n=60$), a incidência cumulativa de morte específica pela doença de 24% enquanto o grupo com expressão de Bcl-2 ($n=87$), apresentam uma incidência cumulativa de 7,7% [$p=0,014$, *hazard ratio* de 0,334, IC 95% (0,133; 0,838)].

Tabela 68 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de Bcl-2 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Bcl-2 Sem expressão ($n=60$)*			Bcl-2 Com expressão ($n=87$)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	58	1,000	0,000	86	1,000	0,000
24	52	0,931	0,069	81	0,988	0,024
36	48	0,887	0,113	80	0,988	0,072
48	45	0,858	0,142	72	0,937	0,023
60	41	0,801	0,199	68	0,937	0,023
72	28	0,755	0,245	51	0,923	0,077
84	21	0,755	0,245	39	0,923	0,077
96	12	0,755	0,245	19	0,923	0,077
108	8	0,755	0,245	13	0,923	0,077
120	0	0,755	0,245	0	0,923	0,077
Valor de p (Log Rank)				0,014		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,334		
IC (95%)**				(0,133; 0,838)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 72 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

Estes resultados sugerem que ausência de expressão de Bcl-2 pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUNMIB, com uma magnitude acrescida de 3 vezes. A expressão de Bcl-2 pelas células tumorais é um fator de proteção de morte específica com uma redução de *hazard* relativo de 67 %.

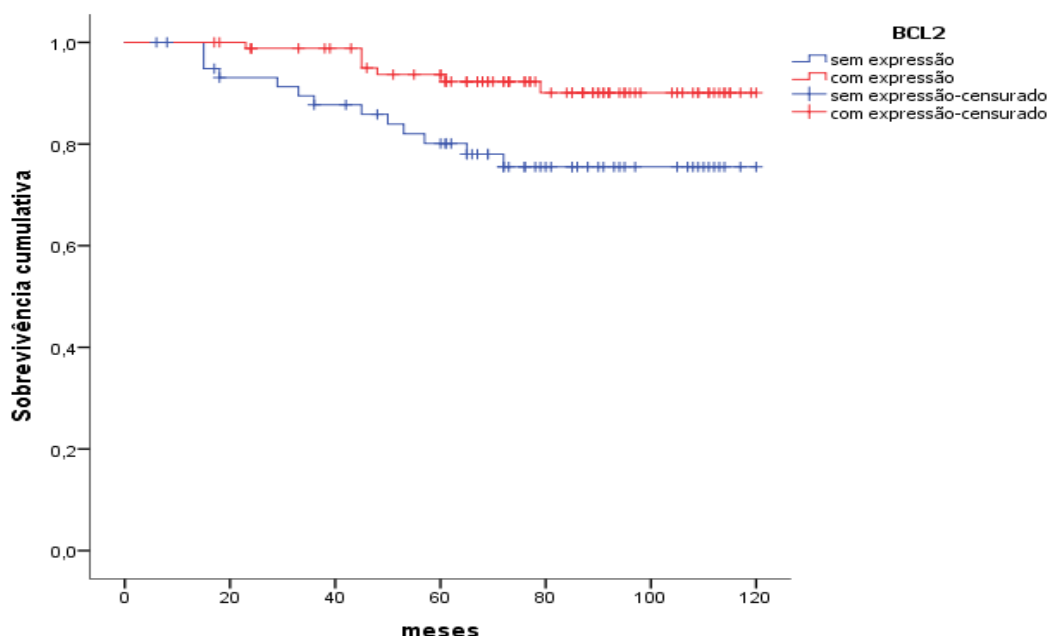


Figura 72 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de Bcl-2.

5.7.3.9 - Caspase 3

Analisa-se a expressão das caspases nas células tumorais considerando dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Na tabela 69 e na figura 73 observamos os resultados da expressão diferencial das caspases nos grupos comparativos face à morte específica da doença. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas resultantes da análise de Kaplan Meier.

Também valor observado é semelhante para os dois grupos, situando-se nos 15% e 17% respetivamente grupo dos doentes com tumores com expressão de caspases e sem expressão de caspases.

Como podemos observar, as curvas de sobrevivência à morte específica da doença são praticamente sobreponíveis e com uma descida pouco acentuada, refletindo a incidência cumulativa de morte específica da doença.

Tabela 69 - Análise de Kaplan-Meier da expressão das caspases relativamente à morte específica

Tempo (meses)	Caspase 3 Sem expressão (n= 71)*			Caspase 3 Com expressão (n=76)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	70	1,000	0,000	75	1,000	0,000
24	64	0,971	0,029	69	0,960	0,040
36	61	0,926	0,034	67	0,960	0,404
48	57	0,880	0,120	60	0,930	0,070
60	51	0,833	0,167	58	0,930	0,070
72	39	0,833	0,167	40	0,875	0,125
84	27	0,833	0,167	33	0,851	0,149
96	12	0,833	0,167	19	0,851	0,149
108	8	0,833	0,167	13	0,851	0,149
120	0	0,833	0,167	0	0,851	0,149
Valor de p (Log Rank)				0,536		
HR (Hazard Ratio)				0,758		
IC (95%)**				(0,314; 1,830)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

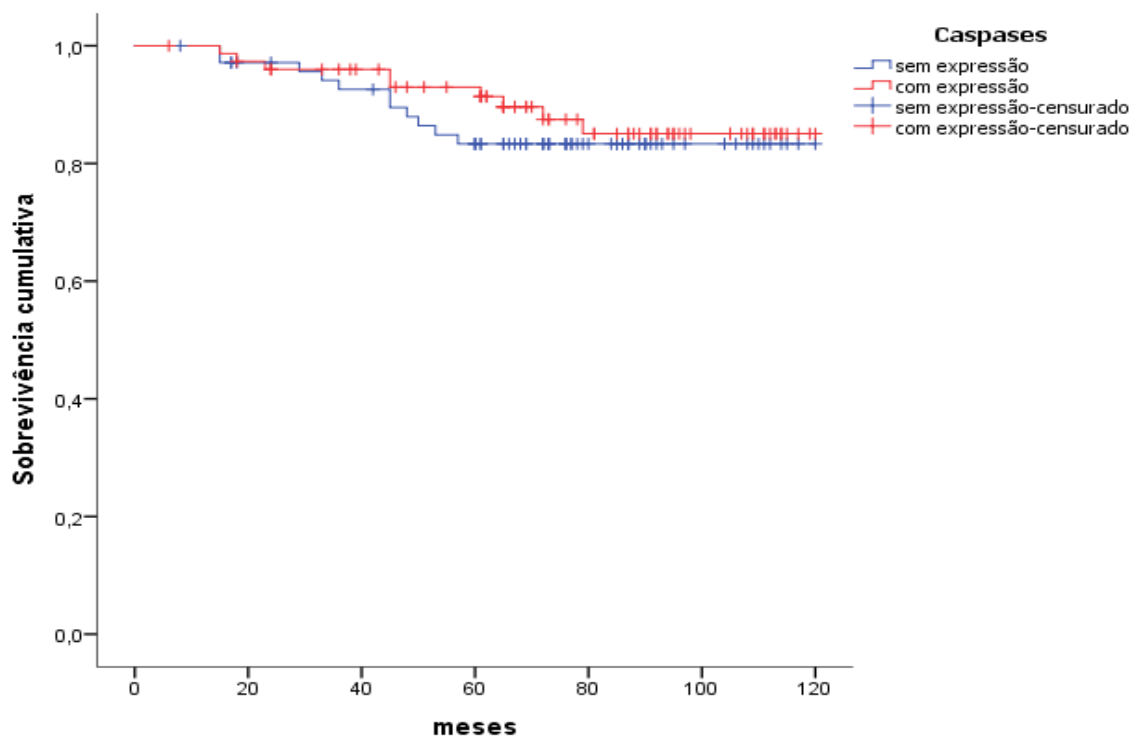


Figura 73 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes com expressão de caspases versus doentes sem expressão de caspases face à morte específica.

5.7.3.10 - CD 44

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão de CD 44 no tempo até à progressão (tabela 70 e figura 74), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,993$) entre os grupos comparativos.

Tabela 70 – Análise de Kaplan-Meier da expressão de CD44 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	CD44 Sem expressão (n= 107)*			CD44 Com expressão (n=40)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	106	1,000	0,000	39	1,000	0,000
24	100	0,962	0,038	33	0,973	0,054
36	96	0,943	0,057	32	0,943	0,113
48	88	0,912	0,088	29	0,883	0,143
60	82	0,892	0,108	27	0,852	0,148
72	61	0,856	0,144	17	0,852	0,148
84	48	0,839	0,161	12	0,852	0,148
96	21	0,839	0,161	10	0,852	0,148
108	15	0,839	0,161	6	0,852	0,148
120	0	0,839	0,161	0	0,852	0,148
Valor de p (Log Rank)				0,993		
HR (Hazard Ratio)				0,996		
IC (95%)**				(0,362; 2,741)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

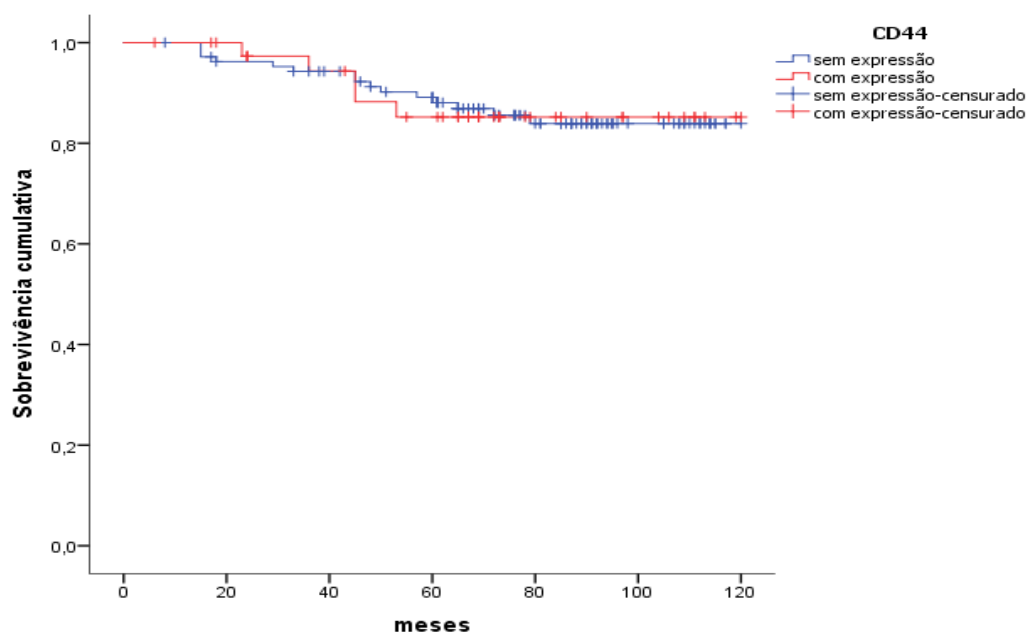


Figura 74 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de CD44.

Relativamente à incidência cumulativa da morte específica da doença, o valor observado para ambos os grupos é equivalente, aspeto que se evidencia no gráfico da figura 66 em que as curvas de sobrevivência cumulativa à morte específica da doença são praticamente coincidentes.

5.7.3.11 - ErbB-2/HER2

A expressão do biomarcador ErbB-2 pelas células tumorais distingue dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão do ErbB-2 no tempo até à morte específica (tabela 71 e figura 75), encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,039$).

Nos doentes sem expressão de ErbB-2 ($n=43$), a incidência cumulativa da ocorrência de morte específica da doença é de 25%, enquanto o grupo com expressão de ErbB-2 ($n=104$), apresentam um valor de 12% [$p=0,039$, *hazard ratio* de 0,410, IC 95% (0,208; 0,942)]

Tabela 71 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de ErbB-2 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	ErbB-2 Sem expressão ($n= 43$)*			ErbB-2 Com expressão ($n=104$)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	42	1,000	0,000	102	1,000	0,000
24	39	0,907	0,093	94	0,990	0,010
36	37	0,884	0,116	91	0,969	0,031
48	33	0,811	0,189	84	0,946	0,054
60	31	0,811	0,189	78	0,912	0,088
72	24	0,751	0,249	55	0,900	0,100
84	19	0,751	0,249	41	0,881	0,119
96	10	0,751	0,249	24	0,881	0,119
108	4	0,751	0,249	17	0,881	0,119
120	0	0,751	0,249	0	0,881	0,119
Valor de p (Log Rank)				0,039		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				0,410		
IC (95%)**				(0,171; 0,986)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Estes resultados sugerem que a ausência de expressão de ErbB-2 pelas células tumorais é um fator de risco para a morte específica do CUNMIB, com uma magnitude acrescido de 2,5 vezes.

A expressão de ErbB-2 pelas células tumorais é um fator de proteção de morte específica com uma redução de *hazard* relativo de 59%.

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 75 evidencia o resultado estatisticamente significativo da análise de Kaplan Meier.

A curva de sobrevivência cumulativa à morte específica pela doença tem uma descida pouco acentuada particularmente no grupo com expressão de ErbB-2, ainda assim, nunca ultrapassando os 50% em ambos os grupos e como tal não existindo tempo mediano de sobrevivência.

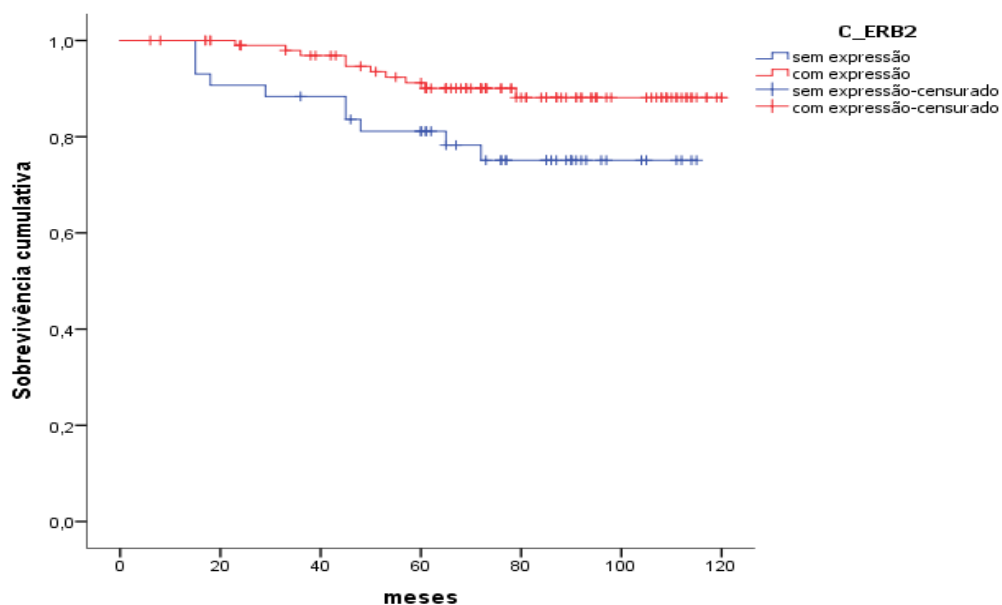


Figura 75 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de ErbB-2.

5.7.3.12 - CK 5/6

Também na análise da expressão do biomarcador CK5/6 nas células tumorais consideramos dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Da análise de Kaplan Meier da influência da expressão de CK5/6 no tempo até à morte específica (tabela 72 e figura 76), não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos ($p=0,643$).

Tabela 72 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 5/6 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	CK 5/6 Sem expressão (n= 121)*			CK 5/6 Com expressão (n=26)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	120	1,000	0,000	25	1,000	0,000
24	110	0,958	0,042	23	1,000	0,000
36	106	0,941	0,059	22	0,957	0,043
48	99	0,913	0,087	18	0,861	0,139
60	92	0,895	0,105	17	0,813	0,187
72	69	0,862	0,138	10	0,813	0,187
84	51	0,847	0,153	9	0,813	0,187
96	25	0,847	0,153	6	0,813	0,187
108	18	0,847	0,153	4	0,813	0,187
120	0	0,847	0,153	0	0,813	0,187
Valor de p (Log Rank)				0,643		
HR (Hazard Ratio)				1,294		
IC (95%)**				(0,432; 3,872)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

A incidência cumulativa da morte específica da doença que se observa para ambos os grupos é equivalente com as curvas de sobrevivência cumulativa praticamente coincidentes.

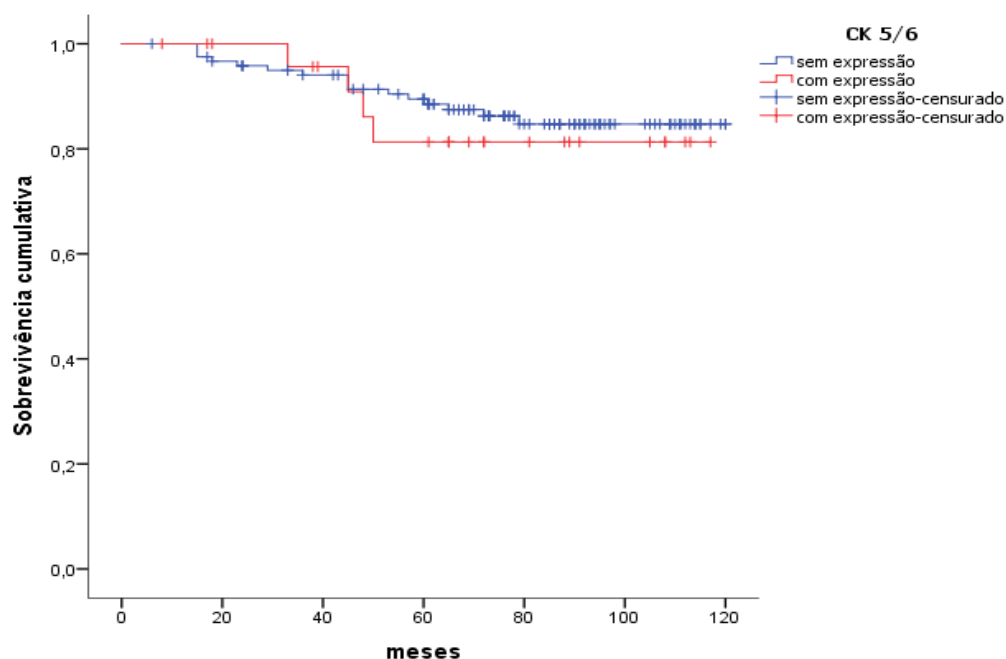


Figura 76 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes de face à morte específica considerando a expressão de CK5/6

5.7.3.13 - CK 20

O padrão de expressão de CK20 nas células tumorais diferencia dois grupos: com expressão do biomarcador e sem expressão do biomarcador.

Quando consideramos a influência da expressão de CK 20 no tempo até à progressão na análise de Kaplan Meier (tabela 73), verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos.

A expressão do CK20 (n=38) nas células neoplásicas está associado a uma taxa de incidência cumulativa de progressão da doença de 36% enquanto o grupo dos doentes cujo tumor não expressa CK20 (n=109) apresentam uma taxa de incidência cumulativa de 8,1% [p<0,001, *hazard ratio* de 4,3, IC 95% (1,778; 10,381)].

Tabela 73 - Análise de Kaplan-Meier da expressão de CK 20 relativamente à morte específica

Tempo (meses)	CK 20 Sem expressão (n= 109)*			CK 20 Com expressão (n=38)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	107	1,000	0,000	38	1,000	0,000
24	104	1,000	0,000	29	0,866	0,154
36	99	0,971	0,029	29	0,866	0,154
48	93	0,951	0,049	24	0,770	0,230
60	86	0,920	0,080	23	0,770	0,230
72	64	0,909	0,081	15	0,695	0,305
84	48	0,909	0,081	12	0,642	0,358
96	23	0,909	0,081	8	0,642	0,358
108	17	0,909	0,081	4	0,642	0,358
120	0	0,909	0,081	0	0,642	0,358
Valor de p (Log Rank)				<0,001		
HR (<i>Hazard Ratio</i>)				4,296		
IC (95%)**				(1,778; 10,381)		

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Estes resultados sugerem que a expressão de CK20 pelas células tumorais é um fator de risco para a progressão do CUBNMI, com uma magnitude acrescida de 4,3 vezes.

A observação das curvas de sobrevivência no gráfico da figura 77 evidencia o resultado estatisticamente significativo obtido através da análise de Kaplan Meier.

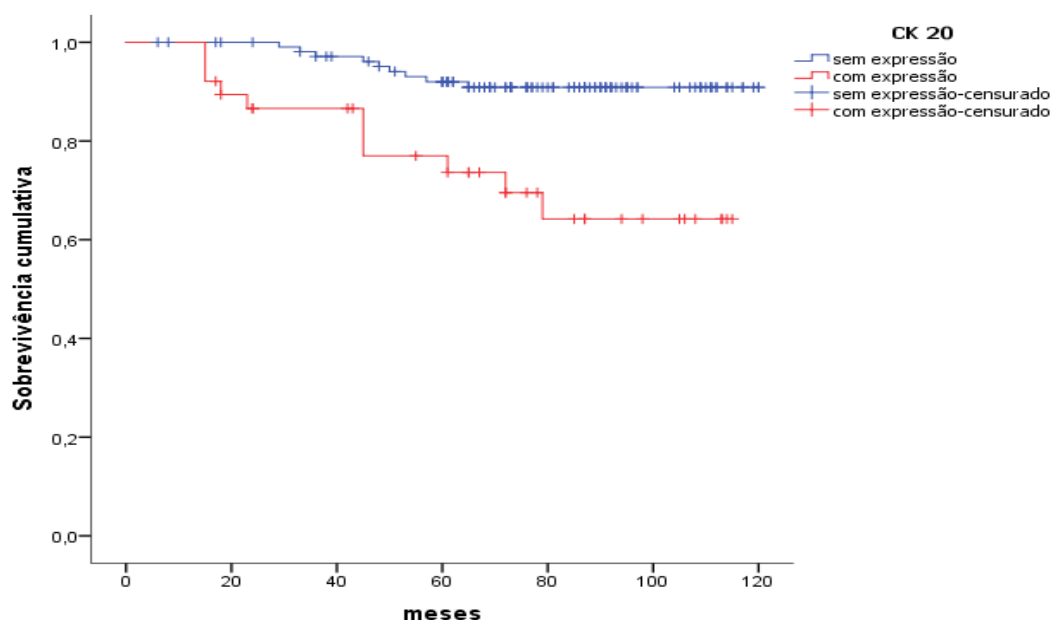


Figura 77 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando a expressão de CK20

5.7.3.14 - Fenótipo Molecular

Como podemos observar na tabela 74 e nas curvas de sobrevivência representadas no gráfico da figura 78, o resultado da análise de Kaplan Meier efetuada mostra diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparativos no tempo até à morte específica ($p < 0,001$). Como anteriormente, na classificação do fenótipo molecular do CUNMIB o grupo comparador para a regressão de Cox é fenótipo nulo.

Os doentes com o fenótipo “luminal” ($n=32$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de morte específica da doença de 43% *versus* 6,1% do fenótipo “nulo” [$p < 0,005$, *hazard ratio* de 8,49; IC 95% (2,299; 13,051)] enquanto os doentes com fenótipo “basal” ($n=20$) apresentam uma proporção de incidência cumulativa de morte específica da doença de 26,1% [$p=0,021$, *hazard ratio* de 4,70; IC 95% (2,942; 24,494)].

O resultado encontrado para o fenótipo “misto” não atingiu significado estatístico para $p < 0,05$, no entanto, em termos descritivos, observamos que a incidência cumulativa de morte específica da doença no fenótipo “nulo” ($n=89$) é de 6%. Nos doentes com expressão do fenótipo misto não se verificaram óbitos especificamente pela doença.

Tabela 74 - Análise de Kaplan-Meier da expressão fenotípica relativamente à morte específica

FENÓTIPO MOLECULAR												
Tempo (meses)	Nulo (n=89)*			Misto (n=6)			Basal (n=20)			Luminal (n=32)		
	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa	Doentes em risco	Proporção de sobrevivência cumulativa	Proporção de incidência cumulativa
12	88	1,000	0,000	6	1,000	0,000	19	1,000	0,000	28	1,000	0,000
24	87	1,000	0,000	6	1,000	0,000	17	1,000	0,000	23	0,840	0,160
36	84	0,977	0,023	6	1,000	0,000	16	0,941	0,059	23	0,840	0,160
48	81	0,977	0,023	6	1,000	0,000	12	0,807	0,193	18	0,720	0,280
60	75	0,952	0,048	6	1,000	0,000	11	0,739	0,261	17	0,720	0,280
72	57	0,939	0,061	3	1,000	0,000	7	0,739	0,261	12	0,629	0,371
84	42	0,939	0,061	3	1,000	0,000	6	0,739	0,261	9	0,567	0,433
96	20	0,939	0,061	3	1,000	0,000	3	0,739	0,261	5	0,567	0,433
108	15	0,939	0,061	1	1,000	0,000	2	0,739	0,261	3	0,567	0,433
120	0	0,939	0,061	0	1,000	0,000	0	0,739	0,261	0	0,567	0,433
Valor de p (Log Rank) <0.001												
HR (Hazard Ratio)				-----				4,705 (2,942; 24.494)			8,488 (2,299; 13,051)	
IC (95%)**												
Valor de p (Wald)				0.985				0,021			<0,001	

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Como se pode observar no gráfico da figura 78, as curvas de sobrevivência à morte específica para os diferentes fenótipos moleculares nulo e misto apresentam uma descida pouco acentuada. O fenótipo luminal apresenta a descida mais acentuada, ainda assim, nunca ultrapassando os 50%.

O fenótipo luminal apresenta casos de morte específica pela doença mais precoce, antes dos 24 meses após o diagnóstico.

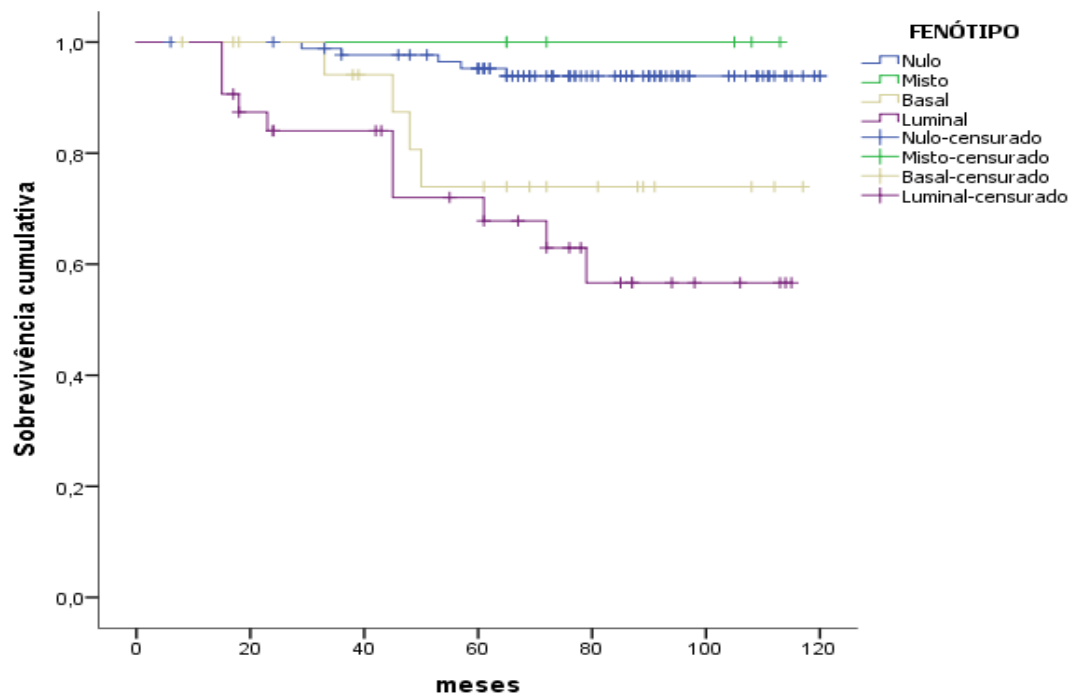


Figura 78 - Comparação entre curvas de sobrevivência dos doentes do face à morte específica considerando o fenótipo molecular.

5.7.4 - Resumo da análise dos fatores de prognóstico nos resultados da morte específica

Paralelamente ao que foi feito para a recorrência, na tabela 75 apresentamos os resultados mais importantes da análise da influência dos fatores de prognóstico estudados relativamente à recorrência da doenças nos doentes estudados. Os fatores de prognóstico com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou próximo de significado estatístico ($p < 0,10$) estão destacados e constituem os fatores de prognóstico a integrar na análise multivariável.

Tabela 75 - Resumo da análise bivariável face à morte específica

Variável (fator de prognóstico)	valor de p (Log Rank)	Hazard Ratio	IC 95%**
Idade (<70 anos* / ≥70 anos)	0,013	3,019	(1,203; 7,576)
Sexo (M*/F)	0,112	0,042	(0,000; 18,664)
D. tumor (< 3 cm* / ≥3 cm)	0,028	3,619	(1,060; 12,355)
Estádio (Ta*/T1)	<0,001	6,151	(2,453; 15,427)
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	8,263	(2,762; 24,725)
Ki67 (< 20%* / ≥ 20%)	0,025	2,845	(1,092; 7,411)
P53 (< 20%* / ≥ 20%)	0,843	0,884	(0,259; 3,017)
P21 (< 5% / ≥ 5%)	0,261	1,852	(0,619; 5,539)
P27 (< 25%* / ≥ 25%)	0,771	1,139	(0,472; 2,750)
Ciclina D1 (< 25%* / ≥ 25%)	0,003	3,806	(1,461; 9,913)
Ciclina D3 (< 25%* / ≥ 25%)	<0,001	6,706	(2,221; 20,252)
Caspases (sem expressão* / com expressão)	0,536	0,758	(0,314; 1,830)
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,019	0,257	(0,075; 0,877)
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	0,014	0,334	(0,133; 0,838)
CD44 (sem expressão* / com expressão)	0,993	0,996	(0,362; 2,741)
ErbB-2 (sem expressão* / com expressão)	0,039	0,410	(0,171; 0,986)
CK 5/6 (sem expressão* / com expressão)	0,643	1,294	(0,432; 3,872)
CK20 (sem expressão* / com expressão)	<0,001	4,296	(1,778; 10,381)
Fenótipo (N*/M/B/L)***	<0,001	--	--
Nulo*			
Misto	0,985#	----	----
Basal	0,021#	4,705	(1,261; 17,550)
Luminal	<0,001#	8,488	(2,942; 24,494)

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

*** Fenótipo: Nulo/Misto/ Basal/ Luminal

valor de p (Wald)

5.8 - Resultados da análise de regressão de Cox multivariável

Os fatores de prognóstico a serem incluídos no modelo multivariável resultaram da seleção apoiada em critérios estatísticos da análise bivariável. Assim, foram incluídas no modelo multivariável as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) ou com um valor p próximo do significado estatístico ($p < 0,10$) de acordo com a sua importância na investigação.

Nas tabelas 76, 78 e 80 apresentamos os resultados mais importantes da análise da influência dos fatores de prognóstico com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou próximo de significado estatístico ($p < 0,10$), relativamente à recorrência, progressão e morte específica respetivamente. Dentro do grupo de fatores de prognóstico com resultado estatisticamente significativo (ou próximo de atingir significado estatístico), excluimos os fatores de prognóstico com resultados estatísticos sugestivos de colinearidade com outros fatores de prognóstico selecionados para análise multivariável. As colinearidades face aos resultados estatísticos da análise bivariável surgiram entre a expressão dos biomarcadores CK 5/6, CK 20 e a expressão da variável fenótipo molecular por nós introduzida com base na expressão destes dois biomarcadores. Assim, decidimos incluir na análise multivariável o fenótipo molecular e excluir a expressão dos biomarcadores CK 5/6 e CK 20 individualmente ainda que estatisticamente significativos.

Na análise multivariável utilizamos a análise de regressão múltipla de Cox com aplicação do método “*Backward*”, eliminando-se em cada “*passo*” a variável com o maior valor de p até atingir um valor de $p < 0,05$ para todas as variáveis. Os resultados assim obtidos, através deste modelo multivariável, resultam no maior número de fatores de prognóstico estatisticamente significativos após ajustamento para os outros fatores de prognóstico, resultando na seleção dos fatores de prognóstico estatisticamente mais importantes e, possivelmente, com maior relevância clínica.

5.8.1 - Análise de regressão de Cox multivariável dos fatores de prognóstico na recorrência tumoral

Deste modo, as variáveis selecionadas para análise multivariável relativamente à recorrência foram o diâmetro do tumor, estágio, grau histológico, Ki-67, ciclina D1, Bax e Fenótipo molecular, estatisticamente significativas para $p < 0,05$ (tabela 76).

Os resultados destas variáveis selecionadas relativamente à recorrência tumoral sugerem com significado estatístico ($p < 0,05$) (ou com tendência para significado estatístico) que os doentes com tumores maiores que três centímetros têm pior prognóstico, o estágio T1 tem pior prognóstico, os doentes com tumor de alto grau têm pior prognóstico, a expressão aumentada de Ki-67 ($\geq 20\%$) tem pior prognóstico, a expressão aumentada de ciclina D1 ($\geq 25\%$) tem pior prognóstico, a ausência de expressão de Bax pelas células tumorais tem pior prognóstico e finalmente o fenótipo molecular luminal tem pior prognóstico que o fenótipo nulo.

Tabela 76 - Resumo dos fatores de prognóstico de maior relevância para a análise multivariável da recorrência

Variável (fator de prognóstico)	valor de p (Log Rank)	Hazard Ratio	IC 95%**
D. tumor (< 3 cm* / ≥ 3 cm)	0,034	1,727	(1,031; 2,994)
Estádio (Ta*/T1)	0,006	1,940	(1,189; 3,165)
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	2,382	(1,502; 3,777)
Ki67 (< 20%* / $\geq 20\%$)	0,030	1,877	(1,047; 3,367)
Ciclina D1 (< 25%* / $\geq 25\%$)	0,008	2,240	(1,202; 4,172)
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,060	0,531	(0,387; 1,029)
CK20 (sem expressão* / com expressão)	0,032	1,690	(1,035; 2,762)
Fenótipo	0,029	---	---
Nulo*	---	1,000	---
Misto	0,536#	0,638	(0,154; 2,644)
Basal	0,405#	1,344	(0,670; 2,694)
Luminal	0,005#	2,145	(1,265; 3,637)

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

valor de p (Wald)

Os resultados da análise de regressão multivariável de Cox (tabela 77) refletem o sentido da análise bivariável no que respeita às associações encontradas, dando evidência estatística ao facto dos CUBNMI de alto grau constituírem um fator de risco para a recorrência ($HR=3,005$; $p < 0,05$), bem como o fenótipo molecular luminal que representa igualmente um fator de risco para a recorrência tumoral ($HR=2,307$; $p < 0,05$).

Tabela 77 - Análise de regressão múltipla de Cox para extração dos fatores de prognóstico mais relevantes para a recorrência tumoral

Variável (recorrência)	Valor de <i>p</i> (Wald)	Hazard Ratio	IC (95,0%)**	
			Inferior	Superior
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	3,005	1,820	4,962
Fenótipo molecular	0,004			
Nulo*	---	1,000	---	---
Misto	0,286	0,459	0,110	1,917
Basal	0,402	0,730	0,349	1,526
Luminal	0,002	2,307	1,350	3,943

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

5.8.2 - Análise de regressão de Cox multivariável dos fatores de prognóstico na progressão tumoral

As variáveis selecionadas para a análise multivariada considerando a progressão tumoral foram o sexo, o estágio, o grau histológico, a expressão de Ki-67, a expressão de ciclina D1, ciclina D3, Bax, Bcl-2, ErbB-2 e o fenótipo molecular (tabela 78).

Tabela 78 - Resumo dos fatores de prognóstico de maior relevância para a análise multivariável da progressão

Variável (fator de prognóstico)	valor de <i>p</i> (Log Rank)	Hazard Ratio	IC 95%**
Sexo (M*/F)	0,062	0,041	(0,000; 7,620)
Estádio (Ta*/T1)	<0,001	6,238	(2,851; 13,650)
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	7,853	(3,166; 19,481)
Ki67 (< 20%* / ≥ 20%)	0,006	2,987	(1,306; 6,830)
Ciclina D1 (< 25%* / ≥ 25%)	0,002	3,534	(1,490; 8,381)
Ciclina D3 (< 25%* / ≥ 25%)	<0,001	6,174	(2,328; 16,372)
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,017	0,326	(0,123; 0,860)
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	0,019	0,412	(0,191; 0,888)
ErbB-2 (sem expressão* / com expressão)	0,029	0,443	(0,208; 0,942)
CK20 (sem expressão* / com expressão)	0,001	3,461	(1,623; 7,378)
Fenótipo molecular	<0,001	---	---
Nulo*	---	1,000	---
Misto	0,654#	1,604	(0,203; 12,661)
Basal	0,035#	3,246	(1,085; 9,708)
Luminal	<0,001#	5,477	(2,299; 13,051)

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

valor de *p* (Wald)

Os resultados das variáveis selecionadas relativamente à progressão tumoral sugerem com significado estatístico ($p < 0,05$) (ou com tendência para significado estatístico) que as mulheres têm melhor prognóstico que os homens, o estágio T1 tem pior prognóstico, os doentes com tumor de alto grau têm pior prognóstico, a expressão aumentada de ciclina D1 ($\geq 25\%$) tem pior prognóstico, a expressão aumentada de Ki-67 ($\geq 20\%$) tem pior prognóstico, a expressão aumentada de ciclina D3 ($\geq 25\%$) tem pior prognóstico, a ausência de expressão de Bax pelas células tumorais tem pior prognóstico, a ausência de expressão de Bcl2 pelas células tumorais tem pior prognóstico, a ausência de expressão de ErbB-2 pelas células tumorais tem pior prognóstico e finalmente o fenótipo molecular luminal e basal têm pior prognóstico que o fenótipo nulo.

Os resultados da análise de regressão de Cox multivariável (tabela 79) refletem o sentido da análise bivariável no que respeita ao sentido das associações encontradas para a progressão tumoral.

Tabela 79 - Análise de regressão múltipla de Cox para extração dos fatores de prognóstico mais relevantes para a progressão tumoral

Variável (progressão)	Valor de p (Wald)	Hazard Ratio	IC (95,0%)**	
			Inferior	Superior
Grau (baixo grau* / alto grau)	$< 0,001$	10,245	3,854	27,234
Ciclina D3 ($< 25\%*$ / $\geq 25\%$)	0,017	4,476	1,314	15,250
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,003	0,155	0,046	0,522
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	0,005	0,280	0,114	0,684
Fenótipo molecular	$< 0,001$			
Nulo*	---	1.000	---	---
Misto	0,082	8,591	0,760	97,065
Basal	0,006	6,271	1,715	22,936
Luminal	$< 0,001$	15,981	5,552	46,003

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

Assim, ter um carcinoma urotelial de alto grau é um fator de risco para a progressão da doença (HR=10,2; $p < 0,05$), a expressão aumentada de ciclina D1 pelas células tumorais ($\geq 25\%$) é um fator de risco para a progressão da doença (HR=4,5; $p < 0,05$), a expressão de do biomarcador Bax pelas células tumorais é um fator protetor da progressão tumoral (HR=0,155; $p < 0,05$), a expressão de do biomarcador Bcl2 pelas células tumorais é um fator protetor da progressão da doença (HR=0,155; $p < 0,05$), o fenótipo molecular basal é um fator de risco para a progressão tumoral (HR=6,3; $p < 0,05$), finalmente o fenótipo molecular luminal é um fator de risco para a progressão tumoral (HR=16,0; $p < 0,05$).

5.8.3 - Análise de regressão de Cox multivariável dos fatores de prognóstico na morte específica

Relativamente à morte específica da doença, as variáveis selecionadas para a análise de regressão de Cox multivariável foram a idade, o diâmetro tumoral, estágio, o grau histológico, a expressão de Ki-67, ciclina D1, ciclina D3, Bax, Bcl-2, ErbB-2 e o fenótipo molecular (tabela 80).

Para a morte específica pela doença, os resultados das variáveis selecionadas sugerem, com significado estatístico ($p < 0,05$) (ou com tendência para significado estatístico), que os doentes com idade superior a 70 anos têm pior prognóstico, os doentes com tumores maiores que três centímetros têm pior prognóstico, o estágio T1 tem pior prognóstico, os doentes com tumor de alto grau têm pior prognóstico, a expressão aumentada de Ki-67 ($\geq 20\%$) tem pior prognóstico, a expressão aumentada de ciclina D1 ($\geq 25\%$) tem pior prognóstico, a expressão aumentada de ciclina D3

Tabela 80 - Resumo dos fatores de prognóstico de maior relevância para a análise multivariável da morte específica

Variável (fator de prognóstico)	valor de p (Log Rank)	Hazard Ratio	IC 95%**
Idade (<70 anos* / ≥ 70 anos)	0,013	3,019	(1,203; 7,576)
D. tumor (< 3 cm* / ≥ 3 cm)	0,028	3,619	(1,060; 12,355)
Estádio (Ta*/T1)	<0,001	6,151	(2,453; 15,427)
Grau (baixo grau* / alto grau)	<0,001	8,263	(2,762; 24,725)
Ki67 (< 20%* / $\geq 20\%$)	0,025	2,845	(1,092; 7,411)
Ciclina D1 (< 25%* / $\geq 25\%$)	0,003	3,806	(1,461; 9,913)
Ciclina D3 (< 25%* / $\geq 25\%$)	<0,001	6,706	(2,221; 20,252)
Bax (sem expressão* / com expressão)	0,019	0,257	(0,075; 0,877)
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	0,014	0,334	(0,133; 0,838)
ErbB-2 (sem expressão* / com expressão)	0,039	0,410	(0,171; 0,986)
CK20 (sem expressão* / com expressão)	<0,001	4,296	(1,778; 10,381)
Fenótipo	<0,001		
Nulo*	---	1,000	---
Misto	0,985 [#]	---	---
Basal	0,021 [#]	4,705	(1,261; 17,550)
Luminal	<0,001 [#]	8,488	(2,942; 24,494)

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

[#] valor de p (Wald)

($\geq 25\%$) tem pior prognóstico, a ausência de expressão de Bax pelas células tumorais tem pior prognóstico, a ausência de expressão de Bcl-2 pelas células tumorais tem pior prognóstico, a ausência de expressão de ErbB-2 pelas células tumorais tem pior prognóstico e finalmente o fenótipo molecular luminal e basal têm pior prognóstico que o fenótipo nulo.

Também para a morte específica pela doença, os resultados da análise de regressão multivariável de Cox (tabela 81) refletem o sentido da análise bivariável dando evidência estatística ao facto do diâmetro tumoral superior a três centímetros representar um fator de risco para a morte específica (HR=5,1; $p<0,001$), ter um carcinoma urotelial de alto grau é um fator de risco para a morte específica (HR=11,6; $p<0,05$), a expressão de do biomarcador Bax pelas células tumorais é um fator protetor para a morte específica (HR=0,062; $p<0,001$), a expressão de do biomarcador Bcl-2 pelas células tumorais é um fator protetor para a morte específica (HR=0,10; $p<0,001$), o fenótipo molecular basal é um fator de risco para a morte específica (HR=7,9; $p=0,008$), finalmente o fenótipo molecular luminal é um fator de risco para a morte específica (HR=25,0; $p<0,001$).

Tabela 81 - Análise de regressão múltipla de Cox para extração dos fatores de prognóstico mais relevantes para a morte específica

Variável	Valor de p (Wald)	Hazard Ratio	IC (95,0%)**	
			Inferior	Superior
D. tumor (< 3 cm* / ≥ 3 cm)	0,024	5,134	1,242	21,224
Grau (baixo grau* / alto grau)	< 0,001	11,635	3,362	40,273
Bax (sem expressão* / com expressão)	< 0,001	0,062	0,013	0,291
Bcl-2 (sem expressão* / com expressão)	< 0,001	0,098	0,028	0,347
Fenótipo molecular	< 0,001			
Nulo*		1,000		
Misto	0,989	----	----	----
Basal	0,008	7,881	1,695	36,644
Luminal	< 0,001	24,893	6,627	93,499

*Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

**IC (95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR

5.9 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico face às variáveis resultado

Em complemento dos resultados obtidos pela análise multivariável na seleção de fatores de prognóstico nos doentes com CIBNMI e com o objetivo de contribuir para um *modelo* de aplicação da expressão dos biomarcadores de prognóstico na prática clínica, apresentamos as taxas de sensibilidade e especificidade, bem como o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico com resultados estatisticamente significativos na análise multivariável de Cox relativamente às variáveis de resultado progressão, recorrência e morte específica.

Os valores de sensibilidade e especificidade, o valor preditivo negativo e o valor preditivo positivo são obtidos, para uma dada categoria do fator de prognóstico, em relação à categoria de referência. Para facilitar a interpretação podemos considerar o fator de prognóstico como um teste de diagnóstico, representando a categoria de referência do fator de prognóstico o negativo do teste, sendo o positivo do teste representado pela categoria em análise. As variáveis resultado, no nosso estudo, a recorrência, a progressão e a morte específica representam a presença ou ausência da doença conforme ocorram ou não durante o estudo.

Assim, na tabela 82 apresentamos os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os fatores de prognóstico resultantes da análise de regressão de Cox multivariável para a recorrência tumoral.

Tabela 82 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico mais relevantes para a recorrência tumoral

Variável (recorrência)	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo (+)	Valor preditivo (-)
Grau (baixo grau* / alto grau)	48	77	67	60
Fenótipo molecular				
Nulo*	--	--	--	--
Misto	5	93	33	56
Basal	21	83	50	56
Luminal	36	83	69	56

*Categoria de referência

Da análise dos resultados obtidos, salientamos que o alto grau histológico tem uma elevada especificidade para a recorrência bem como os fenótipos misto, basal e luminal, embora apresentem sensibilidades baixas. Relativamente ao valor preditivo positivo, a doença de alto grau e o fenótipo luminal apresentam um valor preditivo positivo razoável.

Na tabela 83 apresentamos os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os fatores de prognóstico resultantes da análise de regressão de Cox multivariável para a progressão tumoral.

Tabela 83- Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico mais relevantes para a progressão tumoral

Variável (progressão)	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo (+)	Valor preditivo (-)
Grau (baixo grau* / alto grau)	78	74	40	94
Ciclina D3 (< 25%* / ≥ 25%)	19	97	56	84
Bax (com expressão* / sem expressão)	81	44	24	91
Bcl-2 (com expressão* / sem expressão)	43	63	27	87
Fenótipo molecular				
Nulo*	--	--	--	--
Misto	10	94	17	90
Basal	35	84	25	90
Luminal	57	80	38	90

*Categoria de referência

Na análise dos resultados obtidos, quando consideramos a progressão da doença, salientamos que o alto grau histológico tem uma elevada sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo. Já a expressão da ciclina 3 exibe uma especificidade de 97% com um valor preditivo negativo de 84%. A expressão de Bax pelas células tumorais tem uma elevada sensibilidade e um valor preditivo negativo de 91%. A expressão de Bcl-2 pelas células tumorais tem uma baixa sensibilidade, baixa especificidade e baixo VPP, no entanto tem um VPN de 87 %. Destacamos ainda a elevada especificidade dos fenótipos moleculares (misto, basal e luminal) associada a um valor preditivo negativo de 90%.

A tabela 84 resume os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os fatores de prognóstico resultantes da análise de regressão de Cox multivariável para a morte específica.

Da análise dos resultados obtidos, quando consideramos a morte específica pela doença, salientamos que o diâmetro do tumor superior a 3 centímetros, para além de ser fator de risco para a morte específica, apresenta uma sensibilidade elevada, 85%, e um valor preditivo negativo de 94%. O alto grau histológico continua a apresentar uma elevada sensibilidade e elevado valor preditivo negativo.

Tabela 84 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos fatores de prognóstico mais relevantes para a morte específica da doença

Variável (morte específica)	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo (+)	Valor preditivo (-)
D. tumor (< 3 cm* / ≥3 cm)	85	38	18	94
Grau (baixo grau* / alto grau)	80	71	30	96
Bax (com expressão* / sem expressão)	85	43	19	95
Bcl-2 (com expressão* / sem expressão)	65	63	21	92
Fenótipo molecular				
Nulo*	--	--	--	--
Misto	--	93	--	94
Basal	44	84	20	94
Luminal	68	80	34	94

*Categoria de referência

Dos biomarcadores da via apoptótica, a expressão de Bax pelas células tumorais tem uma elevada sensibilidade e um valor preditivo negativo de 95%, quanto à expressão de Bcl-2 pelas células tumorais tem uma baixa sensibilidade, baixa especificidade e baixo VPP, no entanto, tem um VPN de 92%. Destacamos ainda a elevada especificidade dos fenótipos moleculares (misto, basal e luminal) associada a um valor preditivo negativo de 94%.

5.10 - Aplicação clínica dos biomarcadores moleculares

Ao longo do desenvolvimento do estudo procuramos integrar os fatores clínicos e histopatológicos com os resultados do estudo da expressão de biomarcadores nos tumores uroteliais (obtidos por ressecção transuretral) com o objetivo de caracterizar padrões personalizáveis preditivos da recorrência, progressão e mortalidade específica da doença.

Um dos desafios importantes para os urologistas na abordagem contemporânea do CUBNMI prende-se com a necessidade de estratificação do risco nos doentes com tumor de alto grau, particularmente no T1.

Da análise dos resultados do nosso estudo, verificamos que os fatores de prognóstico independentes presentes em todos os *outcomes*, isto é, para a recorrência tumoral, progressão da doença e morte específica são o grau histológico e o fenótipo molecular.

Tabela 85 - Resumo dos fator de prognóstico independentes face aos *outcomes* do estudo

Variável	Recorrência (HR)*	Progressão (HR)*	Morte específica (HR)*
D. tumor (< 3 cm** / ≥3 cm)			5,134
Grau (baixo grau** / alto grau)	3,005	10,245	11,635
Ciclina D3 (< 25%** / ≥ 25%)		4,476	
Bax (sem expressão** / com expressão)		0,155	0,062
Bcl-2 (sem expressão** / com expressão)		0,098	0,280
Fenótipo Molecular			
Nulo**	--	--	--
Misto			
Basal		6,271	7,881
Luminal	2,307	15,981	24,893

*Hazard Ratio

**Categoria de referência/denominador da comparação

Assim, tendo em vista uma possível aplicação na clínica, resolvemos aplicar a classificação molecular (fenótipo molecular) após a estratificação do CUBNMI por grau histológico.

Estudamos de forma “estratificada” aquele que é um fator independente de prognóstico robusto no nosso estudo, baseado em critérios morfológicos de análise. Assim, aplicaremos separadamente aos tumores de baixo grau e aos tumores de alto grau a classificação molecular relativamente aos *outcomes* anteriormente considerados.

Na tabela 86 apresentamos o resumo da análise de Kaplan Meier da expressão do fenótipo molecular nos tumores de baixo grau (Ta e T1) e utilizando também a análise de regressão de regressão de Cox de forma a estabelecer o *hazard ratio*, tomando por comparador a categoria do fenótipo nulo. Cerca de 70% dos casos pertencem ao fenótipo nulo.

Os fenótipos misto e basal aparecem com uma frequência muito baixa (< 5% dos casos). A recorrência tumoral situa-se nos 40%. A progressão da doença verifica-se em cerca de 6% dos casos e a morte específica da doença verifica-se em cerca de 4 % dos casos. Curiosamente o fenótipo basal, que representa cerca de 5% dos casos, está presente em 50% dos casos de mortalidade específica (embora seja de considerar o muito baixo número de ocorrências).

Tabela 86 - Resumo da análise da expressão fenotípica molecular nos tumores de baixo grau face à recorrência, progressão e morte específica

Baixo grau N=95		Rec. N=38 (%)	HR*** (IC95%)	Prog. N=6 (%)	HR*** (IC95%)	Morte esp. N=4 (%)	HR*** (IC95%)
Fenótipo molecular	N/%	$p=0.183^*$		$p=0.005^*$		$p < 0,001^*$	
Nulo**	66 (69,4)	23 (33,8)		3 (4,5)		2 (3,0)	
Misto	3 (3,2)	1 (33,3)	0,801 (0,11 – 5,93)	0 (0,0)	----	0 (0,0)	----
Basal	5 (5,3)	3 (60,0)	2,75 (0,82 – 9,18)	2 (40,0)	11,6 (1,92 – 69,8)	2 (40,0)	15,7 (2,17 – 106)
Luminal	21 (22,1)	11 (52,4)	1,78 (0,87 – 3,67)	1 (4,8)	1,25 (0,13 – 12,0)	0 (0,0)	----

Rec. – recorrência; Prog. – progressão; Morte esp. – morte específica.

* Teste Log-Rank

** Categoria de referência/denominador

*** HR - Hazard ratio; IC 95% - Intervalo de confiança a 95%

Na figura 79 observamos as curvas de sobrevivência dos doentes com carcinoma urotelial de baixo grau do face à recorrência, progressão e morte específica considerando o fenótipo molecular.

.

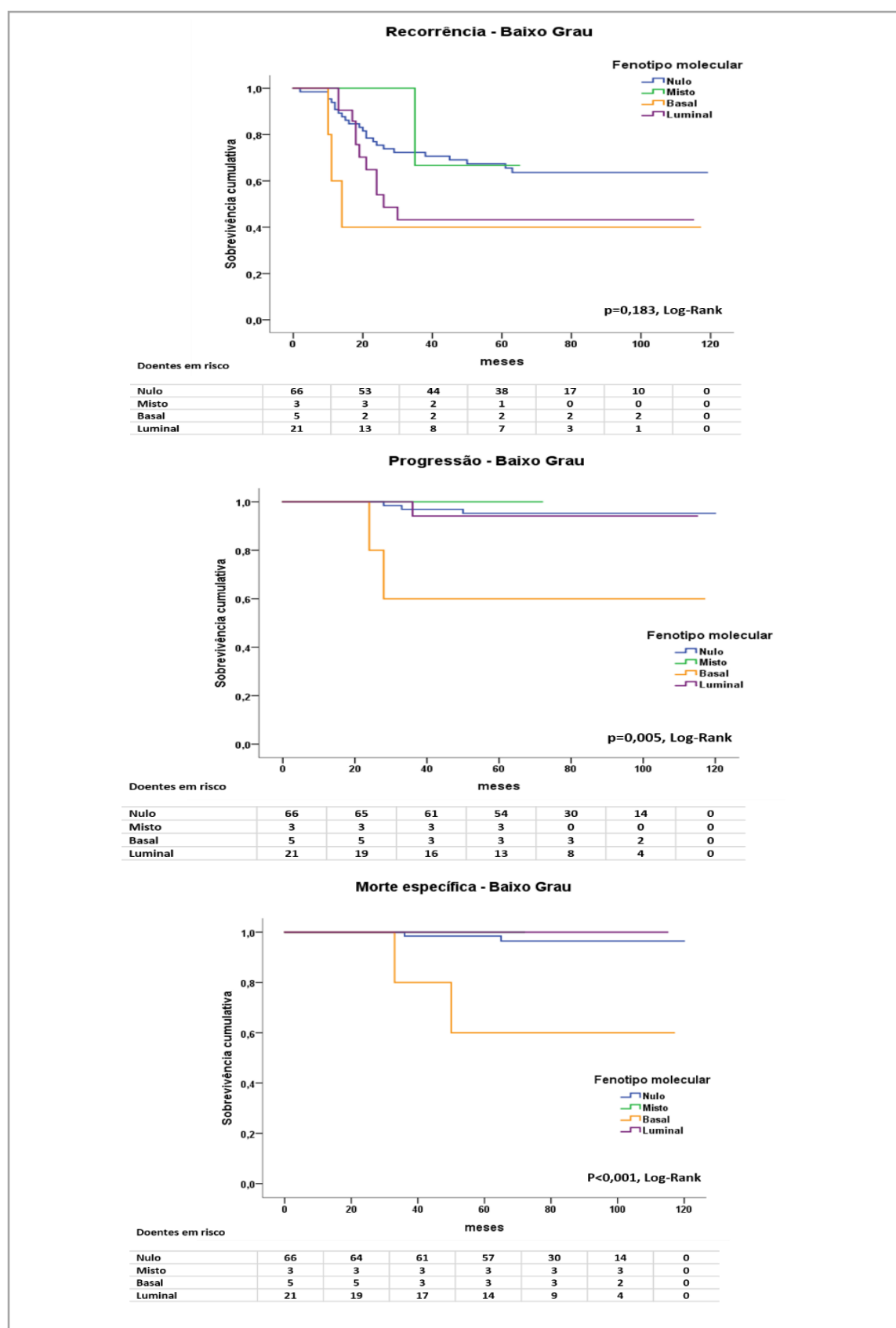


Figura 79 - Comparação da expressão fenotípica molecular nos tumores de baixo grau face à recorrência, progressão e morte específica

Analísamos de forma semelhante o CUBNMI de alto grau, deforma a obter uma estratificação, aplicamos a classificação molecular relativamente aos *outcomes* anteriormente considerados.

Na tabela 87 apresentamos o resumo da análise de Kaplan Meier da expressão do fenótipo molecular nos tumores de alto grau (Ta e T1) e utilizando também a análise de regressão de Cox de forma a estabelecer o *hazard ratio* relativamente à categoria do fenótipo nulo.

O fenótipos misto continua a apresentar uma frequência muito baixa (< 5% dos casos). Cerca de 44% (n=52) dos casos pertencem ao fenótipo nulo. O fenótipo basal representa cerca de 29% dos casos. A frequência relativa do fenótipo luminal mantém-se nos 21%.

Tabela 87 – Resumo da análise da expressão fenotípica molecular nos tumores de alto grau face à recorrência, progressão e morte específica

Alto Grau N=52		Rec. N=35 (%)	HR (IC95%)	Prog. N=21 (%)	HR (IC95%)	Morte esp. N=16 (%)	HR (IC95%)
Fenótipo molecular	N/%	$p<0.001^*$		$p<0.001^*$		$p<0.001^*$	
Nulo**	23 (44,2)	16 (69,6)		6 (26,1)		3 (13,0)	
Misto	3 (5,8)	1 (33,3)	0,332 (0,44 – 2,50)	1 (33,3)	1,32 (0,16 – 11,0)	0 (0,0)	----
Basal	15 (28,9)	7 (46,7)	0,576 (0,24 – 1,40)	3 (20,0)	1,09 (0,27 – 4,39)	2 (13,3)	1,57 (0,26 – 9,42)
Luminal	11 (21,1)	11 (100)	3,179 (1,36 – 7,41)	11 (100)	17,0 (5,42 – 52,8)	11 (100)	17,0 (4,63 – 63,0)

HR - Hazard ratio; IC 95% - Intervalo de confiança a 95%

*Teste Log-Rank

**Categoria de referência/denominador

Na figura 80 observamos as curvas de sobrevivência dos doentes com carcinoma urotelial de alto grau do face à recorrência, progressão e morte específica considerando o fenótipo molecular.

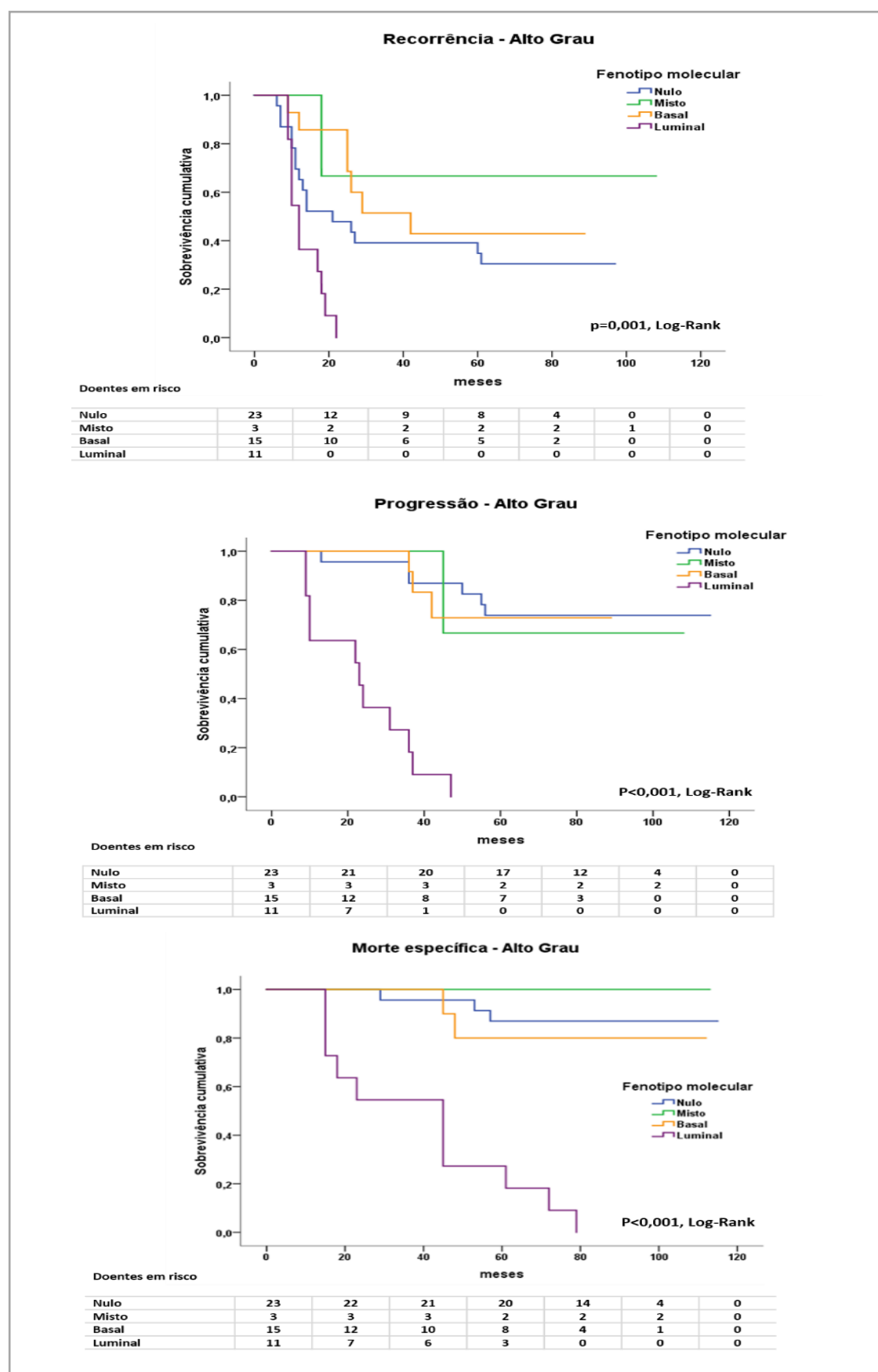


Figura 80 - Comparação da expressão fenotípica molecular nos tumores de alto grau face à recorrência, progressão e morte específica

Em cerca de 70% (n=52) dos doentes observámos recorrência. A progressão da doença verifica-se em cerca de 37 % dos casos e a morte específica da doença verifica-se em cerca de 30 % dos casos.

Para além dos nossos resultados mostrarem que os tumores de alto grau apresentam pior prognóstico em todos os *outcomes* estudados, salientamos que os doentes com o fenótipo luminal apresentam uma incidência cumulativa de recorrência de 100% [$p < 0,005$, *hazard ratio* de 3,18; IC 95% (1,36; 7,41)], uma incidência cumulativa de progressão de 100% [$p < 0,005$, *hazard ratio* de 17,0; IC 95% (5,42; 52,8)] e uma incidência cumulativa de 100% de mortalidade específica da doença. [$p < 0,005$, *hazard ratio* de 17,0; IC 95% (4,63; 63,0)].

O tempo de sobrevivência mediano nos tumores de alto grau com fenótipo luminal é de 12 meses para a recorrência, 22 meses para a progressão. A mortalidade específica da doença é de 50% aos 45 meses.

De facto, no nosso estudo, o fenótipo luminal está presente em cerca de 60% dos casos em que ocorre progressão do tumor de alto grau e em cerca de 69% dos casos em que ocorre mortalidade específica pela doença.

6. Discussão



6. Discussão

O cancro da bexiga (CB) representa um importante problema de saúde pública atendendo à sua incidência que a coloca a nível global no décimo lugar entre as neoplasias mais frequentes.^(1,2,17) É também um dos tumores mais prevalentes nos homens de meia-idade e idosos, nos países desenvolvidos.⁽⁷⁾ A elevada taxa de recorrência com necessidade de terapêutica cirúrgica e o seguimento dos doentes a longo prazo com instrumentação invasiva (cistoscopia) geram uma considerável carga assistencial consumidora de recursos humanos e financeiros nos serviços de saúde, colocando o CUBNMI como o tumor que apresenta maior custo de tratamento por doente durante a vida (desde o diagnóstico até à morte).⁽⁸⁾

Em Portugal, o CB também está entre os tumores mais frequentes, ocupando o sétimo lugar entre as neoplasias com maior incidência, representando cerca de 2900 novos casos em 2012.^(3,298) Os custos relacionados com o CB em Portugal no ano de 2012 ascenderam a cerca de 71 milhões de euros, com custos diretos em cuidados de saúde superiores a 32 milhões de euros.⁽¹⁰⁾ Na União Europeia em 2012, os custos ascendem a 4,9 mil milhões de euros com cerca de 2,9 mil milhões de euros de custos diretos com os cuidados de saúde.⁽¹⁰⁾

A estratificação do risco de acordo com o estágio e grau histológico está bem estabelecida, ambos são fatores preditivos de recorrência, progressão e mortalidade específica da doença. No entanto, apesar da emergência de novas ferramentas diagnósticas e modalidades terapêuticas multimodais, o prognóstico de doentes com CUBNMI é condicionado pela dificuldade que os fatores de risco clínico-patológicos clássicos apresentam em prever para cada doente, com precisão, o resultado dos tratamentos. Esta limitação poderá ser potencialmente superada com a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da doença e a introdução de nomogramas que combinem parâmetros clínicos-patológicos com possíveis biomarcadores preditores de agressividade tumoral e resposta à quimioterapia/imunoterapia adjuvantes sistematicamente avaliados e incluídos nos relatórios de histopatologia.⁽¹⁶⁾

Apesar do elevado número de trabalhos publicados e biomarcadores estudados, nenhum biomarcador molecular tem utilização sistemática na prática clínica.⁽²⁹⁹⁾

O projeto descrito nesta tese insere-se nesta linha de investigação, procuramos integrar o resultado da expressão dos biomarcadores moleculares expressos pelas células tumorais com os resultados dos *fatores preditivos clássicos* tendo por base um estudo de coorte clínico retrospectivo constituído por 147 doentes com o diagnóstico de CUBNMI

(Ta e T1) recrutados consecutivamente no serviço de urologia do Hospital Reina Sofia em Córdoba entre 2002 e 2014. Atendendo à história natural da doença, para obter resultados relevantes em oncologia, são necessários tempos de seguimento dos doentes que se prolongam por vários anos. Neste estudo, a mediana do tempo de observação dos doentes, contado desde o diagnóstico histológico, foi de 76 meses, variando os tempos de seguimento entre 6 meses e 120 meses.

Ao longo deste capítulo procuramos realizar uma síntese dos elementos chave do estudo desenvolvido tendo como referência a hipótese de investigação e os objetivos que a suportaram num quadro referencial alicerçado na revisão da literatura efetuada e nos resultados alcançados.

6.1 - Fatores sociodemográficos

O nosso estudo de coorte clínico retrospectivo é constituído por 147 doentes, sendo 130 homens e 17 mulheres. A idade média, na altura do diagnóstico, foi de 67 anos, o que está de acordo com os descrito noutras séries que situam a idade média de diagnóstico entre os 65 e os 70 anos.^(18,300)

A idade superior a 70 anos revelou-se um fator de risco para a mortalidade específica da doença na análise bivariável [HR - 3,02; IC 95% (1,203; 7,576)], mas não é um fator independente após o ajustamento para outros fatores após a análise de regressão de Cox. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas para a recorrência e progressão entre os grupos de análise.

Num ensaio clínico com 957 doentes com CUBNMI, *Oddens et al* demonstrou que a idade > 70 anos é um fator desfavorável para o prognóstico de doentes tratados com imunoterapia intravesical de manutenção com BCG no que diz respeito ao tempo de progressão, sobrevivência geral e sobrevivência livre de doença, mas não para o tempo de recorrência.⁽²⁸³⁾

Também *Nishiyama et al* conclui que os doentes com CUBNMI com idade > 70 anos, tratados com BCG apresentam uma maior probabilidade de progressão e mortalidade específica.⁽²⁸⁴⁾

Dos 147 doentes que integraram o estudo, 88% eram homens, mostrando um *ratio* cerca de 7:1 entre homens e mulheres, algo distante dos dados da literatura.^(300–303) No entanto, devemos considerar o facto de estarmos a seleccionar para o estudo os casos em que, na *baseline*, o diagnóstico de tumor vesical só incluía carcinoma urotelial não músculo-invasivo o que poderá explicar a diferença encontrada no nosso estudo.

Ao nível do prognóstico, os resultados do nosso estudo também não coincidem com os resultados apontados pela literatura. De facto, apesar de verificarmos uma maior proporção de incidência de recorrência tumoral para as mulheres de 65% *versus* 51% para os homens, embora sem significado estatístico ($p > 0,05$ num teste χ^2), não verificamos casos de progressão e de morte específica pela doença nas mulheres.

Os dados da literatura mostram uma incidência do carcinoma urotelial da bexiga cerca de três a quatro vezes maior nos homens. Ainda assim, nos últimos anos, a incidência do carcinoma urotelial da bexiga tem vindo a aumentar gradualmente entre as mulheres porque o hábito de fumar e a exposição aos produtos químicos se tornou mais comum nas mulheres. Fumar é um fator de risco chave não só para o desenvolvimento do cancro da bexiga, mas também com um impacto marcado sobre o prognóstico.⁽³⁰⁴⁾ Alguns estudos sugerem uma maior magnitude do efeito do tabagismo sobre a sobrevivência relacionada com o cancro da bexiga para as mulheres do que os homens.⁽³⁰⁵⁾

Apesar da maior incidência do carcinoma urotelial da bexiga nos homens, as mulheres têm consistentemente tumores mais avançados no momento do diagnóstico com mortalidade específica aumentada.^(306–308)

Para explicar as diferenças encontradas na incidência e prognóstico do CUB numerosos fatores potenciais podem contribuir para os resultados do comportamento biológico específico de género encontradas nesta neoplasia tais como diferenças anatómicas, variações nos recetores hormonais, diferenças no metabolismo, diferenças nas exposições ou até a disparidade na acessibilidade aos cuidados de saúde.^(302,309,310)

A investigação da potencial relação entre as hormonas sexuais apontada por alguns autores na carcinogénese do tumor da bexiga ou progressão da doença não demonstrou, até ao momento, nenhuma evidência consistente.^(307–309) Num estudo recente, mesmo após o ajuste para alguns destes fatores, a menor sobrevivência das mulheres com o diagnóstico de carcinoma urotelial persistiu, mas com uma aproximação gradual das curvas de sobrevivência para o sexo masculino com o aumento de tempo de *follow-up*.^(311,312)

6.2 - Fatores anatomopatológicos clássicos

No nosso estudo, consideramos variáveis anatomopatológicas clássicas, nomeadamente o diâmetro tumoral (< 3 cm e ≥ 3 cm), o estágio T (Ta e T1) e o grau histológico (baixo grau e alto grau).

6.2.1 - Dimensão tumoral

Está amplamente demonstrado no CUB que a dimensão tumor e a disposição multicêntrica são fatores de risco para a recorrência e progressão tumoral.^(313–316)

No entanto, especificamente para o CUBNMI, o tamanho do tumor mostrou-se associado à recorrência e progressão da doença, sendo o ponto de corte mais comumente utilizado o diâmetro de 3 cm.^(160,313,317) A multifocalidade representa um fator prognóstico mais controverso, que se correlaciona com a recorrência da doença, mas não com a progressão da doença.⁽³¹³⁾ Não foi incluída no presente estudo a análise da multiplicidade dos implantes tumorais, considerada como um dos parâmetros nos calculadores de risco para a recorrência e progressão da EORTC^(160,203) e do CUETO.⁽¹⁶¹⁾

Denzinger et al., no estudo de 132 doentes com T1G3, mostrou que só a presença simultânea de três fatores de risco como a multifocalidade, a dimensão tumoral superior a 3 centímetros e a presença de CIS era preditiva de evolução desfavorável na abordagem conservadora do carcinoma urotelial não músculo-invasivo.⁽³¹⁷⁾

Millán-Rodrigues et al, na análise de 1529 casos de doentes com CUBNMI, apontou como fatores de risco para a recorrência tumoral a dimensão tumoral > 3 centímetros e a multifocalidade do tumor primário.⁽³¹⁸⁾

No nosso estudo, o diâmetro tumoral, quando superior a 3 centímetros, (considerando dois grupos de análise: diâmetro <3 cm e ≥ 3 cm), é um fator de risco para a recorrência tumoral, na análise bivariável [HR - 1,76 (IC 95% 1,01-3,04], e para a morte específica constitui um fator de risco independente na análise multivariável [HR - 5,13 (IC 95% 1,24-21,2]. No entanto, não é estatisticamente significativo relativamente à progressão tumoral.

6.2.2 - Estádio

O mais recente sistema de estadiamento para o carcinoma urotelial da bexiga, revisto em 2016, amplamente usado na prática clínica, é a classificação da AJCC/TNM (American Join Committee of Cancer: *Tumor, Node, Metastasis*),⁽¹⁵⁶⁾ baseado em dados clínicos e imagiológicos (com confirmação citológica ou histológica da doença) permite estabelecer a extensão do processo neofomativo. As categorias do estágio T do tumor primário na bexiga são definidas pela extensão da invasão do tumor através de sua parede do órgão.

Herr et al., numa análise multivariada com 221 doentes com CUNMIB, relatou uma menor eficácia da terapêutica adjuvante com BCG intravesical na prevenção da progressão tumoral em tumores T1 relativamente aos tumores Ta.⁽³¹⁹⁾ Também o grupo CUETO confirmou que os tumores T1 se correlacionam com a progressão de forma estatisticamente significativa comparado com o estágio Ta.⁽³¹³⁾

Por outro lado, *Millán-Rodrigues et al.*, na análise de 1529 casos de doentes com CUBNMI (Ta e T1) concluiu que o estágio não é um fator de risco para a recorrência, progressão ou mortalidade específica.⁽³¹⁸⁾ *Lopez-Beltran et al* distingue os tumores T1 de alto e baixo grau dos tumores Ta de baixo grau que seriam considerados uma entidade clínica distinta pelo seu bom prognóstico.⁽³²⁰⁾

No nosso estudo dos tumores não músculo-invasivos da bexiga, consideramos os tumores Ta e T1 que se diferenciam pelo facto de os tumores T1 apresentarem invasão da lâmina própria.⁽¹⁵⁶⁾ Os resultados mostram que o estágio T1 é um fator de risco para a recorrência [HR - 1,94- IC 95% (1,18; 3,16)], progressão [HR - 6,24 - IC 95% (2,9; 13,6)], e morte específica [HR- 6,15 - IC 95% (2,45; 15,4)] na análise bivariável. No entanto, não é um fator de risco independente após o ajustamento para outros fatores na análise de regressão de Cox multivariável para nenhum dos *outcomes* considerados.

6.2.3 - Grau histológico

A quarta edição da classificação da OMS de tumores do sistema urinário e órgãos genitais masculinos, publicada em 2016, fornece uma revisão contemporânea da morfologia das neoplasias uroteliais da bexiga, enfatizando sua capacidade única de exibir diferenciação divergente, múltiplas variantes morfológicas e diversidade genómica.^(150,152) Também, relativamente à classificação da OMS dos CUBNMI (Ta e T1), encontramos divergência no valor preditivo de prognóstico em diferentes estudos. É certo que a classificação da OMS de 1973 ainda continua a ser preferida em muitos estudos contemporâneos relativamente às classificações mais recentes de 2004 e 2016 por apresentar uma diferenciação mais fina dos CUBNMI, mas a categoria G2 é também ela tema de variabilidade interobservador mesmo entre patologistas experientes.^(12,150,163,170,321)

Muitos trabalhos confirmam a utilidade da classificação do grau histológico na previsão da recorrência e/ou progressão no CUBNMI.^(322,323)

Num estudo retrospectivo, *Chen et al.*, analisou 348 casos de doentes com o diagnóstico de CUBNMI aplicando os critérios de classificação da OMS de 1973 e 2004 com o

objetivo de comparar o valor preditivo dos sistemas de classificação em uso relativamente à recorrência e progressão tumoral, concluiu que ambos os sistemas de classificação são efetivos na previsão da progressão, embora a classificação da OMS de 1973 seja mais adequada na previsão da recorrência tumoral.⁽³²⁴⁾

Pan et al, num estudo com 1515 doentes com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da classificação OMS de 2004 na recorrência, progressão e mortalidade específica no CUBNMI (Ta e T1) concluí que este sistema é valido na atribuição de distintas categorias prognósticas, contribuindo para a estratificação terapêutica nos doentes com CIBNMI.⁽³²⁵⁾

No nosso estudo, seguimos os parâmetros da classificação da OMS de 2016^(150,152) para os CUBNMI, distinguindo tumores de alto grau e de baixo grau, revelou o tumor de alto grau como um fator de risco para a recorrência, progressão e mortalidade específica na análise bivariável. Também na análise multivariável, o tumor de alto grau é fator de risco independente para a recorrência [HR - 2,65 - IC 95% (1,60; 4,40)], progressão [HR - 10,2 - IC 95% (3,85; 27,3)] e morte específica [HR- 11,6 - IC 95% (3,36; 40,3)].

Quando combinamos o estágio T (Ta e T1) com o grau histológico (alto grau e baixo grau), ambas variáveis histopatológicas clássicas de valor preditivo de recorrência, progressão, o comportamento biológico do CUBNMI é determinado primeiro pelo grau e secundariamente pelo estágio, assim, na comparação de tumores com igual estágio, os tumores de alto grau têm um comportamento clínico mais agressivo.⁽³²⁵⁾

Ainda no nosso estudo não identificamos casos na categoria T1BG, o que está de acordo com alguns estudos em que a ocorrência é pouco frequente.^(325,326) No estudo de *Gontero et al*, o Ta de alto grau (TaAG), como definido pelo sistema de classificação OMS 2004/2016, não pode ser equiparado ao CUBNMI de alto risco. O risco de progressão para a doença músculo-invasiva é baixo, mais em consonância com uma categoria de risco intermediário de CUBNMI.⁽³²⁷⁾

Os tumores da categoria TaAG representam cerca de 19% (n=15) dos tumores de alto grau, apresentando um comportamento clínico entre o Ta de baixo grau e o T1 de alto grau numa categoria intermédia de risco para a progressão tumoral na análise bivariável [(HR - 4,9 (IC 95% 1,38- 17,8)] para o TaAG *versus* T1AG [HR - 9,2 (IC95% 3,6 – 23,2)] tomando a categoria TaBG como referência e para a morte específica [HR 5,4 (IC 95% 1,20- 23,7)] para o TaAG *versus* T1AG [HR - 9,4 (IC 95% 3,1–29,0)] tomando igualmente a categoria TaBG como categoria de referência. Não encontramos diferenças entre as categorias TaAG e T1AG relativamente à recorrência.

6.3 - Biomarcadores Moleculares

A avaliação histopatológica do tecido tumoral continua a ser a abordagem *gold standard* no diagnóstico das neoplasias uroteliais. A caracterização histopatológica, particularmente o grau histológico e o estágio têm profundas implicações no tratamento do doente e continuam a fornecer informações importantes sobre o prognóstico já que apresentam valor preditivo da recorrência, progressão.^(161,213,328–333)

No entanto, é necessário reconhecer as limitações destes fatores preditivos a nível individual já que uma das características clínicas do carcinoma urotelial da bexiga é a sua heterogeneidade de manifestações morfológicas e comportamento biológico que são acompanhados (por vezes precedidos) de múltiplas alterações moleculares, condicionado a existência de diferentes fenótipos da doença. A introdução dos biomarcadores moleculares e o conhecimento das principais vias da carcinogénese urotelial, potencialmente, contribuem para a possibilidade de aumentar a precisão e personalização da terapêutica e do prognóstico da doença.^(334,335)

A carcinogénese urotelial da bexiga é um processo complexo, combinando várias etapas, onde se demonstra que a maioria das proteínas intermediárias (biomarcadores) estão interligadas através de múltiplas vias metabólicas. Considerando a complexidade das alterações moleculares associadas ao CUB, é improvável que um único marcador tenha capacidade de diferenciar com precisão tumores de fenótipos semelhantes em diferentes categorias de prognóstico.^(98,99,143,336)

Os marcadores moleculares mostram potencial de valor prognóstico de longo prazo quando combinados com o sistema de pontuação do EORTC e podem ser usados para melhorar a precisão preditiva do sistema de estratificação atualmente existente. No entanto, séries maiores são necessárias para confirmar estes resultados.⁽³³¹⁾

6.3.1 - Ki-67, biomarcador de proliferação celular

O Ki-67 é um dos biomarcadores mais utilizados na avaliação da proliferação celular por métodos de imunohistoquímica. Múltiplos trabalhos apontam para a utilidade da expressão do biomarcador como preditivo de recorrência, progressão e mortalidade específica da doença.^(167,233,337–339) A expressão aumentada de Ki-67, avaliada por métodos de imunohistoquímica, está associada a mau prognóstico no carcinoma urotelial da bexiga.⁽³⁴⁰⁾

Luo et al. demonstrou, numa metaanálise incluindo 82 estudos com 13.053 doentes, que a elevada expressão de Ki-67 está estatisticamente associada a um pior

prognóstico da doença, referindo o Ki-67 como um indicador independente para o prognóstico em doentes com CUBNMI. No entanto, recomenda a realização de estudos prospetivos para confirmar a relação entre a expressão do biomarcador e o prognóstico dos doentes com CUBNMI da bexiga.⁽³⁴⁰⁾

Recentemente, *Ding et al.* mostrou que, combinando fatores clínico-patológicos dos scores de risco da EORTC⁽³²⁸⁾ com a expressão de Ki-67, usando técnicas de imunohistoquímica, recorrendo a escalas semi-quantitativas para reportar as áreas com imunomarcação, pode melhorar a estratificação de risco do CUBNMI. No mesmo estudo, os resultados sugerem ainda que a combinação do perfil de expressão de Ki-67 nos tumores de alto risco com a classificação da EORTC melhora a precisão de previsão de progressão.⁽³⁴¹⁾

Numa metaanálise realizada com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da expressão de Ki-67 no CUBNMI, *Ko et al.* concluiu que a elevada expressão do biomarcador está associada a taxas de recorrência significativamente mais elevadas que os tumores com baixa expressão do biomarcador.⁽³⁴²⁾

Quintero et al., num estudo com doentes com diagnóstico de CUBNMI (Ta e T1), concluiu que a expressão elevada de Ki-67 está associada à recorrência e progressão da doença, mostrando mesmo, na análise multivariável, ser um fator preditivo independente de recorrência, progressão e mortalidade específica.⁽³⁴³⁾

No entanto, a definição de expressão elevada resulta da definição do valor de *cutoff* que apresenta uma elevada variabilidade entre os estudos, sendo o valor de 20% considerado apropriado e bem estabelecido para definir expressão elevada de Ki-67 no CUBNMI.⁽³⁴⁰⁾

Os resultados obtidos no nosso estudo, usando o valor de *cutoff* de 20%, estão de acordo com os estudos que referem a elevada expressão de Ki-67 com valor preditivo no prognóstico do CUBNMI. A elevada expressão de Ki-67 (> 20%) ocorreu em cerca de 15% dos tumores, e mostrou-se estatisticamente significativa na recorrência [HR - 1,88, IC 95% (1,047; 3,367)], progressão [HR - 2,99, IC 95% (1,306; 6,83)], e morte específica [HR - 2,85, IC 95% (1,092; 7,41)] na análise bivariável. Porém, na análise de regressão de Cox multivariável, não constituiu um fator independente preditor para nenhum dos *outcomes* estudados

6.3.2 - Biomarcadores do ciclo celular

Os biomarcadores de regulação do ciclo celular estão entre os mais intensamente estudados na CUB e incluem p53, p21, p27 e as ciclinas D1 e D3.^(94,134,218,244,288,344–346)

O ciclo celular consiste numa sequência hierárquica de processos finamente coordenados que regulam a proliferação celular. A desregulação do ciclo celular nas etapas dos pontos de verificação (*checkpoints*) pode desencadear a carcinogénese. A progressão através do ciclo celular é mediada, em parte, pela síntese de ciclinas, proteínas que ativam as cinases dependentes de ciclina (CDKs) que por sua vez fosforilam a proteína do retinoblastoma (pRB), proteína resultante da transcrição do gene RB, um supressor tumoral clássico e fundamental no *checkpoint* G1/S (que permite a replicação do DNA e a progressão no ciclo celular). Os inibidores da CDKs como o p21, p27, atuam com *supressores* na progressão da célula no ciclo celular. A proteína p53 serve como “*guardião do genoma*” regulando múltiplos mecanismos de bloqueio à progressão do ciclo celular se a célula apresentar alterações morfológicas e/ou funcionais disruptivas no material genético.⁽⁹³⁾

Defeitos na complexa rede de coordenação/regulação dos processos do ciclo celular, particularmente no ponto de verificação G1/S são apontados como “*obrigatórios*” para o desenvolvimento do CUB. No entanto, talvez pela existência das múltiplas vias redundantes para estimular efetores a jusante, há resultados inconsistentes na literatura sobre o uso de um único marcador de regulação do ciclo celular com fator prognóstico no carcinoma urotelial.⁽³⁴⁷⁾ Assim, vários estudos sugerem a possibilidade de efeito cooperativo envolvendo múltiplos reguladores do ciclo celular.^(134,135,244,286,348)

A análise imunohistoquímica da expressão de diferentes reguladores do ciclo celular contribuiu não só para a clarificação da patogénese molecular da CUB, mas também teve um impacto prognóstico.^(96,236,241,288) Muitos reguladores do ciclo celular podem ser avaliados por imunohistoquímica realizada em tecidos tumorais conservados em blocos de parafina.^(96,237,241,273,349,350)

Mutações nos genes de regulação do ciclo celular são alterações frequentemente encontradas no processo carcinogénico, sendo a mutação do gene supressor tumoral *TP53*, cuja expressão é a proteína p53, apontada como a mais frequentemente encontrada no cancro, incluindo o CUB.^(351,352) Embora, na maioria desses estudos, o aumento da expressão nuclear de p53 seja referida como preditiva de valor prognóstico, encontramos dados inconclusivos dados sobre o papel do p53 na biologia do cancro e principalmente na sua aplicação à prática clínica.^(134,135,353)

A expressão de p53, por técnicas de imunohistoquímica, em estudos de referência com o objetivo de diferenciar o prognóstico não apresenta concordância.⁽³⁵⁴⁾ Numa análise crítica acerca das causas na origem desses resultados aparentemente discrepantes é frequentemente apontada a variabilidade nos anticorpos utilizados, diferentes valores de *cutoff* na discriminação das categorias de análise e inconsistências na aplicação da técnica imunohistoquímica.^(244,355,356)

Moonen et al. não encontrou valor adicional na análise da mutação p53 no prognóstico clínico-patológico de 105 doentes com o diagnóstico de CUBNMI de alto risco.⁽³⁵⁷⁾

Outro estudo realizado por *Esuvaranathan et al.* mostrou que a sobre expressão nuclear de p53 não era preditivo de resposta ao *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) intravesical, recorrência tumoral, progressão ou sobrevivência específica.⁽³⁵⁸⁾

Resultados semelhantes foram obtidos por *Lopez-Knowles et al.*, num estudo usando técnicas de imunohistoquímica e sequenciamento genético de 119 tumores, verificou que ocorre inativação da via p53 na maioria dos tumores T1 grau 3 e a expressão de p53 não acrescentaram valor prognóstico adicional.⁽³⁵⁹⁾

Para outros estudos, a inclusão da expressão de p53 melhorou a previsão da sobrevida livre de recidiva em doentes com pT1-2N0.^(241,360)

No estudo de *Shariat et al.* que incluiu 80 doentes com CUB pT1 tratados com cistectomia radical e linfadenectomia pélvica, a expressão alterada de p53 foi encontrada em 25% dos doentes e foi referida como fator independente associado à recorrência de CUB (HR - 3,66) e à mortalidade específica da doença (HR - 5,25), levando a concluir que a expressão de p53 contribui para a estratificação do risco em doentes com T1 com impacto na decisão terapêutica.⁽²⁴¹⁾

No nosso estudo, cerca de 16% dos tumores apresentavam uma expressão aumentada de p53 ($\geq 20\%$). No entanto, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na análise da expressão de p53 relativamente à recorrência, progressão ou morte específica da doença considerando um valor de *cutoff* de 20% na diferenciação dos grupos de análise. Estes resultados, possivelmente refletem as características da coorte de doente no nosso estudo (cerca de 75% dos tumores no estágio Ta e 64% dos tumores eram de baixo grau), já que a maior parte dos trabalhos atribuem utilidade clínica prognóstica de progressão em CUBMI e em tumores de maior agressividade.^(129,241,353,355,360)

A proteína p21, produto da expressão do gene *CDKN1A*, inibe a atividade dos complexos ciclina/CDKs 2 e 4 e funciona como um regulador da progressão do ciclo celular no ponto de verificação G1.^(249,288)

Na literatura encontramos resultados controversos relativamente ao valor preditivo da expressão de p21 no CUBNMI. O valor prognóstico da expressão alterada de p21 depende do estágio e do tratamento do CUB.^(96,356) A ausência de expressão de p21 pode mediar o fenótipo de resistência à terapêutica adjuvante.⁽³⁵⁶⁾

No estudo de *Shariat et al.* em doentes com CUBNMI, a expressão alterada de p21 foi indicada como fator de progressão da doença. A análise combinada de p21 com a expressão de outros biomarcadores do ciclo celular como o p53, pRB e o p27 revelou, neste estudo, a possibilidade de estratificação dos doentes com CUBNMI em diferentes grupos de risco para a recorrência e progressão da doença com significado estatístico.⁽²³⁶⁾

No nosso estudo, os resultados da análise da expressão de p21 mostraram em cerca de 68% dos tumores uma expressão aumentada de p21 ($\geq 5\%$), o que está de acordo com o referido na literatura que refere que a expressão do p21 no CUBNMI está aumentada, contrastando com a ausência de expressão nos tumores musculoinvasivos.^(96,240) No entanto, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na análises da expressão de p21 para a recorrência, progressão ou na morte específica da doença.

O biomarcador p27^{Kip1} é um membro da família Cip/Kip de inibidores de CDKs, que se liga à CDK2 e inibe a atividade de fosforilação enzimática levando à suspensão da progressão no ciclo celular na fase G1. Níveis aumentados de p27^{Kip1} servem como uma barreira para a progressão para a fase S. Níveis decrescentes de proteína de p27^{Kip1} estão associados a fenótipos celulares mais agressivos com aumento da recorrência e mortalidade específica.^(245,246)

O valor preditivo da expressão alterada de p27 no CUB também não é constante nos diferentes estudos disponíveis na literatura. Assim, no estudo já anteriormente referido, *Shariat et al.* refere a expressão alterada de p27 com valor preditivo de recorrência e progressão no CUBNMI.⁽²⁴¹⁾ Também *Schrier et al.* encontrou valor preditivo na expressão alterada de p27.⁽³⁶¹⁾

Também para a expressão do biomarcador p27, no nosso estudo, não encontramos diferenças estatisticamente significativas relativamente aos *outcomes* do nosso estudo. Os resultados mostram uma expressão aumentada de p27 ($\geq 25\%$) em cerca de 54% dos tumores.

No nosso trabalho também estudamos a expressão nuclear das ciclina D1 e D3, proteínas que formam complexos ciclina/CDKs 4 e 6 que, por sua vez, promovem a fosforilação e a inativação da proteína do retinoblastoma (pRB), com efeito sobre a

progressão celular na transição da fase G1 para a fase S.^(167,331) A desregulação da transição G1/S é uma característica do CUB permitindo a proliferação celular descontrolada. As ciclinas D e E são responsáveis pelas fases inicial e final do G1, respetivamente.⁽⁹⁶⁾

Numa metaanálise sobre o impacto da sobre expressão da ciclina D1 no prognóstico do CUB, Ren *et al.* encontrou uma relação entre os níveis aumentados de ciclina D1 e a sobrevivência livre de doença, sugerindo que as alterações genéticas na ciclina D1 são eventos precoces na génese tumoral.⁽³⁶²⁾

Na análise da expressão alterada da ciclina D1 em doentes com CUB, Shariat *et al.* não encontrou associação com as características clínicas ou patológicas da CUB. A perda de expressão da ciclina D1 mostrou associação com o aumento da recorrência e mortalidade específica no CUB na análise univariável, mas a análise multivariável, ajustada para os efeitos das características patológicas, não mostrou associação estatisticamente significativa.⁽³⁶³⁾

Estes resultados são consistentes com outros estudos mostrando que as alterações na expressão da ciclina D1 constituem um evento precoce na cadeia de eventos carcinogénese urotelial da bexiga, mas não adicionam significado prognóstico.⁽²⁴⁷⁾

A análise dos nossos resultados sugere que a ciclina D1 é um preditor de recorrência, o que está de acordo com outros estudos sobre o papel das ciclinas “D” no CUBNMI.^(331,364,365)

A elevada expressão ciclina D1 ($\geq 25\%$) ocorreu em cerca de 10% dos tumores, e mostrou-se estatisticamente significativa na recorrência [HR-2,24; IC 95% (1,202; 4,172)], progressão [HR-3,54; IC 95% (1,490; 8,381)] e morte específica [HR – 3,81, IC 95% (1,461; 9,913)] na análise bivariável. Porém, na análise de regressão de Cox multivariável, não constitui um fator independente preditor para nenhum dos *outcomes* estudados.

A expressão anormal da ciclina D3, outro regulador chave do ciclo celular, foi documentada em várias neoplasias humanas. O gene da ciclina D3, mapeado no cromossoma 6p21, codifica uma proteína de 35 kD, que partilha 53% de homologia de sequência com ciclina D1 mas é induzida mais tarde na fase G1 do ciclo celular.^(167,248,364)

No estudo de Lopez-Beltran *et al.*, os resultados mostram que a expressão da ciclina D3 é um fator preditor independente para a sobrevida livre de progressão [risco relativo (RR) = 5.2] em doentes com CUBNMI (Ta e T1).⁽²⁴⁸⁾

Na nossa série, a expressão aumentada da ciclina D3 ($\geq 25\%$) ocorreu em cerca de 6% dos tumores, e mostrou-se estatisticamente significativa na progressão [HR-6,47; IC 95% (2,328; 16,372)] e morte específica [HR-6,70; IC 95% (2,221; 20,252)] na análise bivariável. Na análise de regressão de Cox multivariável, a expressão aumentada da ciclina D3 ($\geq 25\%$) surge como um fator preditivo independente de progressão da doença [HR-4,48; IC 95% (1,314; 15,250)] o que está de acordo com os resultados encontrados noutros estudos.⁽²⁴⁸⁾

6.2.3 - Biomarcadores da apoptose

Estudamos a expressão dos biomarcadores das vias da apoptose, Bcl-2 e Bax e igualmente a expressão da Caspase 3. A expressão das proteínas Bax e Bcl-2 refletem a complexidade das vias apoptóticas mitocondriais envolvendo as proteínas da família Bcl-2. O balanço entre a expressão das proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, avaliada por métodos imunohistoquímicos, reflete a complexidade deste equilíbrio e os dados dos diferentes estudos são, por vezes, contraditórios.^(251,253,254,289,366–370)

Alterações nos mecanismos de regulação da morte celular programada podem contribuir para o estágio inicial do CUBNMI, particularmente, a sobre expressão de Bcl-2 é apontada como um evento molecular precoce frequentemente envolvido na carcinogénese da bexiga.⁽³⁶⁸⁾

As proteínas Bcl-2 e Bax têm efeitos opostos na apoptose. Estruturalmente, Bcl-2 é uma proteína localizada na membrana nuclear, mitocondrial e do retículo endoplasmático. A expressão aumentada de Bcl-2 tem efeito anti-apoptótico que resulta em proliferação celular, estando associada a estádios clínico-patológicos avançados, à recorrência da doença e à mortalidade específica.⁽³¹⁰⁾ Em contraste, a expressão aumentada da proteína Bax promove a apoptose. Por outro lado, a proteína Bax pode ligar-se com Bcl-2, anulando o efeito anti-apoptótico reconhecido à expressão aumentada de Bcl-2.^(372–374)

A maior parte dos estudos publicados sobre a expressão do Bax no carcinoma urotelial da bexiga referem-se à doença músculo-invasiva e indicam que expressão aumentada de Bax é um fator de prognóstico independente para a sobrevida livre de doença.^(253,254,367)

No CUBNMI, a sobre expressão de Bax está relacionada com o melhor prognóstico.⁽³⁶⁹⁾ *Gonzalez-Campora et al.* apontou a sobre expressão de Bax como um preditor independente de sobrevida global.⁽²⁵¹⁾

Num estudo prospetivo com o objetivo de investigar o valor prognóstico e preditivo das expressão de Bcl-2 e Bax na resposta à imunoterapia com BCG em doentes com CUBNMI, *Ajili et al.* concluiu que a expressão aumentada de Bax e Bcl-2 diminui a sensibilidade à imunoterapia com BCG.⁽²⁵⁴⁾ Está estabelecida igualmente a importância da apoptose das células cancerígenas como um mecanismo chave na resposta terapêutica à quimioterapia.⁽³⁷⁵⁾

No nosso estudo, a expressão de Bax é estatisticamente significativa na análise bivariável e multivariável para a progressão e morte específica da doença. A expressão de Bax verificou-se em cerca de 40% dos tumores e constatamos que a expressão do biomarcador é um fator protetor independente preditivo da progressão da doença [HR - 0,155; IC 95% (0,046; 0,522)], e morte específica [HR - 0,062, IC 95% (0,013; 0,291)], o que está de acordo com os resultados de outras séries que indicam que, no CUBNMI, a expressão de Bax está relacionada com melhor prognóstico,⁽³⁶⁹⁾ e é um preditor independente de sobrevida global.⁽²⁵¹⁾

Relativamente à expressão de Bcl-2, é igualmente estatisticamente significativa na análise bivariável e multivariável no nosso estudo para a progressão e morte específica da doença. Em cerca de 60% dos tumores verificamos a expressão do biomarcador, o que, no nosso estudo, constitui um fator protetor independente preditivo da progressão da doença [HR - 0,380, IC 95% (0,114; 0,684)], e morte específica [HR - 0,098, IC 95% (0,028; 0,347)]. Este resultado é curioso uma vez que a proteína Bcl-2 tem primariamente um efeito anti-apoptótico e a sobre expressão de Bcl-2 é apontada como um evento molecular precoce na carcinogénese da bexiga⁽³⁶⁸⁾ que resultaria em proliferação celular, estando associada à recorrência da doença e à mortalidade específica.⁽³¹⁰⁾

Devemos considerar que a proteína Bax pode ligar-se com a Bcl-2, anulando o efeito anti-apoptótico reconhecido à expressão aumentada de Bcl-2.⁽³⁷²⁻³⁷⁴⁾ Assim, a expressão de Bax e Bcl-2 no CUBNMI poderia refletir um fenótipo menos agressivo ou o estágio inicial da doença, que, por fim, poderá estar associado a um prognóstico favorável.

O nome "caspase" significa cysteine-aspartic-acid-proteases e constituem uma família de endoproteases implicadas na morte celular programada (apoptose). O valor preditivo da expressão da caspase-3 nas células do CUB varia com os diferentes estudos e

também com o estágio da doença. *Giannopolou et al.*, na análise da expressão de caspase-3 em doentes com CUB, não encontrou correlação entre a expressão de caspase-3 e os fenótipos mais agressivos relativamente ao grau histológico e o estágio da doença.⁽³⁷⁰⁾

Em oposição a estes resultados, *Karam et al.*⁽³⁷¹⁾ no estudo de doentes com CUB tratados com cistectomia radical observou a perda de expressão de caspase-3 em cerca de 49% dos tumores em associação com estádios clinico-patológicos mais avançados e presença de metastização. A perda de expressão de caspase-3 foi, neste estudo, um preditor independente de mortalidade específica da doença após cistectomia radical.

A expressão de caspase 3, no nosso estudo, não apresenta resultados estatisticamente significativos na análise bivariável ou multivariável para a recorrência, progressão ou na morte específica da doença.

6.3.4 - ErbB-2/ HER2/*neu* (Human epidermal growth factor receptor 2)

O biomarcador ErbB-2 (também conhecido como HER2/*neu* - human epidermal growth factor receptor 2), pertence à *família* de proteínas *ErbB*, conhecida como a *família* de recetores do fator de crescimento epidérmico.⁽²⁵⁶⁾ O oncogene ErbB-2 /HER-2/*neu* está localizado no cromossoma 17 (q11-21) e codifica uma proteína transmembrana do recetor do fator de crescimento de tirosina cinase. A ativação do recetor ErbB-2 /HER-2/*neu* resulta no aumento da atividade mitótica e no potencial metastático das células tumorais.^(256,258) A sobre expressão do biomarcador HER-2/*neu* está demonstrada em diversos estudos apontando para o seu envolvimento na patogénese de diversas neoplasias, particularmente no cancro da mama.^(376,377)

No caso dos CUB, a expressão do HER-2/*neu* é variável, geralmente a sobre expressão está associada a carcinomas uroteliais pouco diferenciados com um significado prognóstico controverso.⁽²⁵⁸⁾ Outros estudos referem a expressão aumentada do biomarcador em cerca de um terço dos tumores uroteliais, embora não estabeleçam uma correlação com o estágio, grau histológico e prognóstico global.^(257,378,379)

Chakravarti et al. sugeriu que o aumento de expressão de HER-2/*neu* no CUB se correlaciona com ao aumento de resistência à quimioterapia e à radioterapia, constituindo um fator de prognóstico para a recidiva pós terapêutica.⁽³⁸⁰⁾

No estudo de Mellon *et al.* o significado prognóstico da expressão de ErbB-2 parece limitado,⁽³⁸¹⁾ embora outros estudos concluam que o ErbB-2 pode ser aplicável como um marcador tumoral para avaliação de potencial infiltrativo e metastático do CUB.⁽³⁸²⁾

Ainda, numa metaanálise recente, *Chen et al.* concluiu que existe uma associação significativa entre expressão aumentada de HER2/*neu* e recorrência do CUB e estágio do tumor.⁽³⁷⁹⁾ Em contraste com o estudo anterior, *Vollmer et al.* mostrou que a expressão aumentada de HER-2/*neu* não era um fator relevante para o prognóstico do CUB, referindo ainda que, nos CUB de alto grau, a presença de HER-2/*neu* estava relacionada com uma menor probabilidade de invasão local pelo tumor.⁽¹²⁸⁾ Particulmente no CUBNMI, *Tetu et al.* não encontrou associação entre a expressão aumentada de HER-2/*neu* e a recorrência do tumor.⁽³⁷⁸⁾

No nosso estudo, a expressão aumentada de ErbB-2 foi observada em 70 % dos doentes. Não encontramos diferença com significado estatístico na expressão de ErbB-2 relativamente à recorrência tumoral. A expressão de ErbB-2 mostrou-se estatisticamente significativa na progressão [HR - 0,443, IC 95% (0,208; 0,964)] e morte específica [HR – 0,410, IC 95% (0,171; 0,986)] na análise bivariável. A expressão do biomarcador revelou-se um fator protetor, o que poderá estar de acordo com o estudo de *Vollmer et al.* que mostrou que a expressão aumentada de ErbB-2 não era um fator relevante para o prognóstico do CUB e que a sua expressão no CUB estava relacionada com uma menor probabilidade de invasão local pelo tumor.⁽¹²⁸⁾ Na análise de regressão de Cox multivariável, a expressão de ErbB-2 não constitui, no nosso estudo, um fator independente preditor para nenhum dos *outcomes* estudados.

6.3.5 - CD 44

A preservação da adesão intercelular é fundamental para a manutenção da arquitetura tecidual normal. A disrupção da adesão intercelular nos tecidos neoplásicos é considerada um evento precoce no processo de invasão dos tecidos circundantes e metastização para órgãos distantes. A CD44, uma glicoproteína transmembrana, é reconhecida como uma das moléculas de adesão que desempenha um papel importante nas interações célula-célula e célula-matriz. A expressão do CD44, no urotélio normal, só se verifica nas células da camada basal.^(144,383,384)

O padrão de expressão de CD44 nas células do tecido tumoral obtido por RTU-V tem sido estudado como um potencial preditor do comportamento do CUBNMI relativamente ao risco de progressão da doença. Teoricamente, a diminuição da expressão do CD44 que se observa no CUBMI pouco diferenciado poderá ter significado prognóstico se observado no CUBNMI.⁽³⁸⁵⁾ Embora os resultados de diferentes estudos não sejam concordantes, genericamente, no CUB, a expressão de CD44 apresenta uma

correlação inversa com o grau histológico e estágio tumoral, podendo constituir um parâmetro adicional na identificação do risco de recorrência tumoral.^(262,386,387)

No CUBNMI, a informação sobre as implicações prognósticas da expressão de CD44 são limitadas, no entanto, nas fases mais precoces da carcinogênese observa-se um aumento na expressão do gene CD44 em relação ao urotélio normal, com uma diminuição progressiva da expressão à medida que os tumores adquirem um fenótipo mais agressivo.^(260,388,389)

Stavropoulos et al., num estudo de CUBNMI (Ta e T1), não detetou diferenças com significado estatístico na expressão de CD44 nos tumores Ta em comparação com T1. No entanto, surgiram diferenças significativas na expressão do biomarcador na comparação dos tumores músculo-invasivos *versus* não músculo-invasivos. A perda de expressão da forma padrão CD44s nos estádios avançados da doença poderá estabelecer evidência do envolvimento de CD44 na carcinogênese urotelial da bexiga e na progressão da doença para formas músculo-invasivas.⁽³⁹⁰⁾ Também *Kuncová et al.* demonstraram que a progressão para estádios mais avançados do CUB se associa a uma diminuição na expressão de CD44, maior atividade proliferativa de células tumorais e sobre expressão de p53.⁽³⁹¹⁾

A expressão de CD44, no nosso estudo, não apresenta resultados estatisticamente significativos na análise bivariável ou multivariável para a recorrência, progressão ou na morte específica da doença. Este resultado é concordante com outros trabalhos que analisam a expressão de CD44 em CUBNMI.^(260,388–390)

6.2.6 - CK 5/6 e CK 20 na expressão do fenótipo molecular

A expressão topográfica diferencial das citoqueratinas pelo urotélio *normal*, nomeadamente a CK 5/6 e a CK20, estudada por métodos de imunohistoquímica, bem como os padrões de expressão alterada exibidos no CUBNMI, constituem um parâmetro preditivo do comportamento biológico dos tumores.^(265,269)

No CUBNMI esses padrões de expressão *normal* podem manter-se, no entanto, é frequente a alteração ou a perda do padrão de *expressão urotelial* à medida que o grau ou estágio do tumor aumenta, o que constitui um indicador não apenas do nível de diferenciação urotelial, mas também tem valor prognóstico.⁽²⁶⁸⁾

Consideramos que diferentes perfis de expressão topográfica poderiam ser incorporados nas estratégias de acompanhamento clínico-patológicas já que o valor

preditivo destes dois marcadores (CK20 e CK5/6) é reconhecido relativamente à recorrência e progressão no CUB.^(268,271,273)

Cerca de 18% dos tumores no nosso estudo exibem uma expressão anómala de CK5/6. No entanto, a expressão “*individualizada*” de CK5/6 não apresenta resultados estatisticamente significativos na análise bivariável ou multivariável relativamente aos *outcomes* do nosso estudo.

Relativamente à expressão “*individualizada*” de CK20, os resultados obtidos no nosso estudo mostram que a expressão (atípica) pelas células tumorais é estatisticamente significativa relativamente à recorrência [HR - 1,69, IC 95% (1,035; 2,762)], progressão [HR- 3,46; IC 95% (1,623; 7,378)] e morte específica [HR - 4,30, IC 95% (1,778; 10,381)] na análise bivariável.

No nosso estudo utilizamos a expressão de CK5/6 e CK20, *biomarcadores substitutos*, como base da classificação molecular no CUBNMI com base em técnicas de imunohistoquímica acompanhando alguns estudos recentes que sugerem que os CUB poderiam ser classificados em dois subtipos moleculares distintos, referidos como luminal e basal, embora a maioria das publicações disponíveis se refiram ao CUBMI.^(96-98,102–107,109,341–343) Os carcinomas uroteliais do tipo luminal são caracterizados por um *padrão de expressão* semelhante às camadas intermédia/superficial do urotélio normal. Mostraram a regulação positiva dos genes alvo do PPAR γ e expressão aumentada de FGFR3⁽³⁹⁸⁾ com sobre expressão de E-Caderina, HER 2/3, Rab-25 e Src.⁽¹⁷⁷⁾ Os tumores basais mostram *um padrão de expressão* semelhante à camada basal do urotélio normal com a regulação positiva dos genes alvo p63, o aumento das mutações de *TP53* e *RB1* com sobre expressão de CD49, Ciclina B1 e EGFR.⁽¹⁷⁷⁾

As expressões imunohistoquímicas de apenas dois marcadores foram suficientes para identificar os subtipos moleculares intrínsecos do carcinoma urotelial de bexiga com uma precisão superior 90%, para o subtipo luminal (***GATA3***) e para o subtipo basal (CK5/6).⁽¹⁷⁷⁾ Um estudo recentemente publicado por *Sikil et al*, utilizando a análise da expressão de CK5 (basal) e CK20 (luminal), em doentes com carcinomas do urotélio superior, recorrendo a técnicas de imunohistoquímica, identificou carcinomas uroteliais com mortalidade específica da doença significativamente aumentada.⁽¹⁷⁴⁾

O conceito de classificadores moleculares é apoiado pelos dados do *Cancer Genome Atlas* (TCGA) que realizou a caracterização molecular completa de 131 CUBMI,⁽¹⁰⁸⁾ sugerindo a divisão em dois subtipos: luminal e basal. Neste trabalho os carcinomas uroteliais de tipo basal apresentam um prognóstico significativamente pior, com ativação de EGFR e sensibilidade à terapêutica anti-EGFR.⁽¹⁷⁷⁾

Relativamente ao CUBNMI, *Patschan et al* ⁽¹⁷⁹⁾ mostrou diferenças no resultado em doentes no estágio T1 estratificados para o subtipo molecular.

Curiosamente, os resultados do nosso estudo também mostraram uma associação estatística entre subtipos luminal / basal molecular e parâmetros de agressividade no CUBNMI, confirmando a possibilidade do uso de imunohistoquímica de CK20 / CK5-6 como *biomarcadores substitutos* dos subtipos moleculares sem recurso a tecnologia complexa^(174,181) e, portanto, apoiando a hipótese do uso potencial do *grau molecular* na prática clínica como preditor de agressividade em doentes com CUBNMI.

Um número limitado de estudos abordou a questão dos marcadores imunohistoquímicos na previsão do resultado em CUBNMI após a introdução da classificação taxonómica molecular do carcinoma urotelial da bexiga.^(174,177,181) Recentemente, foi publicado um sistema de classificação simples que divide o carcinoma urotelial em categorias “*luminal* e *basal like*”, um sistema de classificação análogo ao cancro da mama.^(181,399,400) Enquanto os carcinomas luminais expressavam genes frequentemente associados a *umbrella cells* superficiais e com características morfológicas dos tumores papilares superficiais, os carcinomas basais expressavam genes mais característicos de células basais uroteliais e apresentavam um prognóstico significativamente pior embora com resposta favorável à quimioterapia neoadjuvante e/ou imunoterapia.^(160-167,246,346,348-352,355,356)

O nosso estudo seguiu um raciocínio semelhante com aplicação ao CUBNMI de um classificador de grau molecular com a maioria dos casos (60%) apresentando fenótipo nulo (CK20-, CK5/6-), seguido pela expressão do fenótipo luminal (CK20+, CK5/6-) (22%), fenótipo basal (CK20-, CK5/6+) (14%) e, finalmente, uma categoria de fenótipo misto (CK20+, CK5/6+) representando 4% dos casos. Nesta classificação do fenótipo molecular do CUNMIB o grupo comparador para a regressão de Cox é fenótipo “nulo”, isto é, o fenótipo sem expressão anómala destes biomarcadores.

O fenótipo molecular, no nosso estudo, surge como um fator preditor independente para a recorrência, para a progressão e para a morte específica. Curiosamente, o grau molecular luminal foi preditivo de tumores mais agressivos nos CUBNMI, sendo o único fator de prognóstico independente preditivo de recorrência, progressão e morte específica na análise de regressão de Cox multivariável, para além grau histopatológico (um parâmetro morfológico clássico).

O fenótipo *luminal* apresenta uma taxa de recorrência de 72% e mais precoce (tempo mediano de sobrevivência à recorrência de 19 meses), constitui um fator preditivo

independente para a recorrência [HR – 2,31; IC 95% (1,350; 3,943)], progressão [HR- 15,981; IC 95% (5,552; 46,003)] e morte específica [HR – 25,0, IC 95% (6,63; 94,5)].

O fenótipo *basal* é um também um fator preditivo independente para a progressão [HR- 6,27; IC 95% (1,715; 22,936)] e morte específica [HR – 7,88; IC 95% (1,695; 36,664)].

Os resultados obtidos mostraram também que os graus moleculares nulos ou mistos são característicos de tumores com um comportamento biológico menos agressivo.

Desta forma, sendo o *fenótipo molecular* um preditor independente para todos os *outcomes* do nosso estudo, surge como um parâmetro com relevância potencial para integração num algoritmo de decisão clínica. Naturalmente, estudos de validação são necessários para corroborar os nossos achados em coortes prospetivas com um maior número de doentes.

Como já referimos anteriormente, um dos desafios importantes para os urologistas na abordagem clínica do CUBNMI prende-se com a necessidade de estratificação do risco nos doentes com tumores de alto grau, particularmente cT1. Portanto, se validada no CUBNMI, a classificação molecular poderia ajudar a estratificar os doentes em categorias relevantes para o prognóstico, ajudando no processo de decisão clínica. A integração destes resultados na prática clínica é particularmente importante nos tumores de alto grau (Ta e T1) que têm indicação para terapêutica adjuvante que inclui BCG intravesical, já que a classificação molecular poderá potencialmente identificar doentes com tumores refratários à imunoterapia intravesical adjuvante. Isso não é surpreendente, uma vez que os dados resultantes do TCGA sugerem que os casos de CUBMI luminal apresentam uma resposta terapêutica limitada ou nula à imunoterapia sistémica, podendo ocorrer um fenómeno semelhante com a imunoterapia com BCG intravesical, hipótese que necessita de investigação em estudos prospetivos.⁽³⁹⁹⁾

A classificação molecular do fenótipo basal associado a casos agressivos também pode sugerir a necessidade do uso de quimioterapia intravesical e imunoterapia, uma vez que, como mostram os dados gerados pelo TCGA em CUBMI, os tumores basais apresentam um maior potencial de resposta a esses agentes. Naturalmente, esta hipótese precisa igualmente de ser investigada em estudos clínicos prospetivos.

O fenótipo luminal, no CUBNMI de alto grau, como observado no nosso estudo, representa doença de alto risco com um prognóstico significativamente pior em todos os *outcomes* do estudo. De facto, os doentes com o fenótipo luminal em tumores de alto grau apresentam 100% de recorrência [hazard ratio de 3,18; IC 95% (1,36; 7,41)], 100% de progressão [hazard ratio de 17,0; IC 95% (5,42; 52,8)] e 100% de mortalidade específica da doença. [hazard ratio de 17,0; IC 95% (4,63; 63,0)].

Também é significativo o facto de este “subgrupo” de CUBNMI representar cerca de 60% dos casos em que ocorre progressão do tumor de alto grau e em cerca de 69% dos casos em que ocorre mortalidade específica pela doença.

Hipoteticamente, o grau molecular luminal mais agressivo no CUBNMI de alto grau pode também apoiar a decisão clínica na seleção de modalidades terapêuticas para a doença de alto risco, nomeadamente a cistectomia radical.

6.4 - Limitações do estudo

As limitações associadas aos processos de investigação são uma realidade com que todos os investigadores têm necessariamente de conviver. O desenvolvimento da investigação envolve um conjunto de decisões metodológicas em relação às quais, de forma sistemática se anteciparam e ponderaram as vantagens e as limitações. Assumem-se, assim, desde o início, as limitações associadas à natureza da investigação e aos métodos e de tratamento dos dados, que ao longo deste ponto explicitaremos.

O nosso projeto de investigação tem por base um estudo observacional retrospectivo de uma coorte clínica constituída por 147 doentes com o diagnóstico de CUBNMI e, como tal, apresenta possíveis vieses de seleção e informação. O viés de seleção pode ser identificado já que os doentes que integram esta coorte clínica eram residentes na área de influência do Hospital Reina Sofia em Córdoba.

O viés de informação pode ser identificado na dificuldade de controlo de variáveis, já que muitos dos doentes já tinham morrido quando o estudo foi iniciado. Por outro lado, o esquema de tratamento adjuvante a que alguns dos doentes foram submetidos difere do esquema atualmente utilizado. Para diminuir os vieses de informação, os doentes cuja informação não se encontrava completa não foram incluídos no estudo.

O nosso estudo da expressão de biomarcadores moleculares pelas células dos tecidos tumorais tem por base a utilização de técnicas de imunohistoquímica. A utilização desta metodologia com baixo custo e o facto de estar disponível em praticamente todos os laboratórios de anatomia patológica surge como uma vantagem para a sua utilização clínica, no entanto, a interpretação dos dados está dependente do observador e a observação é geralmente baseada em escalas qualitativas ou semi-quantitativas. A interpretação da expressão imunohistoquímica do biomarcador pode ser causa de erro sistemático que tentamos minimizar com a metodologia utilizada na interpretação dos

resultados (detalhada no capítulo dos materiais e métodos) por três uropatologistas sem conhecimento da história clínica dos doentes.

Quando um biomarcador quantitativo é utilizado na clínica, é necessário especificar um valor de corte (*cutoff*) acima do qual (ou abaixo do qual) o resultado é considerado normal/positivo (ou atípico/negativo). O posicionamento do ponto de corte necessita de um compromisso entre a sensibilidade (probabilidade de classificar corretamente os doentes com a doença/condição) e especificidade (probabilidade de classificar corretamente aqueles sem a doença/condição). O ponto de corte ideal está dependente de vários critérios não só estatísticos como também clínicos e histopatológicos e está dependente igualmente da coorte de doentes estudada. No nosso estudo a definição do *cutoff* para os *biomarcadores quantitativos* foi baseado em estudos anteriores referidos na revisão da literatura e, claramente, não está isento de viés. Assim, todo o processo metodológico de categorização de biomarcadores que geram diferentes perfis de risco exigem validação externa para verificar se os padrões encontrados se comportam de forma similar em coortes diferentes. A padronização dos métodos imunohistoquímicos na determinação da expressão dos biomarcadores e o estabelecimento de critérios inequívocos de positividade são determinantes para que as vantagens que são reconhecidas à técnica se mostrem igualmente reprodutíveis.

7. Conclusão e Perspetivas Futuras

7. Conclusão e perspectivas futuras

Ao longo deste estudo, à semelhança de qualquer processo de investigação, ambicionámos contribuir para a construção de conhecimento útil, neste caso particular, na “*Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo*”, representa o tributo para uma melhor compreensão dos parâmetros biológicos que parecem influenciar a agressividade do carcinoma urotelial não músculo-invasivo da bexiga e que podem ser investigados como potenciais biomarcadores de prognóstico na previsão da evolução, da resposta à terapêutica e como ferramenta de apoio à decisão clínica.

Antes de mais, entendemos o carcinoma urotelial da bexiga como um problema de Saúde Pública pela sua incidência e prevalência, ocupando o segundo lugar entre as neoplasias urológicas e situando-se entre as dez neoplasias mais frequentes a nível global. Acresce ainda que, por doente, é uma das que maiores custos representam para os serviços de saúde.

A avaliação histopatológica do tecido tumoral continua a ser *gold standard* na fase do diagnóstico e têm profundas implicações no tratamento e no prognóstico da doença, como vimos anteriormente, apresenta valor preditivo na recorrência, progressão e mortalidade específica. No entanto, é necessário reconhecer as limitações destes fatores preditivos a nível individual num tempo em que a medicina de precisão ou medicina personalizada surge como um novo paradigma para os próximos anos. É particularmente importante na área oncológica, a integração de biomarcadores moleculares com a capacidade de estabelecer prospectivamente a agressividade, a probabilidade de recorrência, o risco de progressão e precisar o prognóstico da doença e a seleção do tratamento num doente particular. Na última década assistimos à identificação de numerosos biomarcadores no carcinoma urotelial, que contribuíram para o reconhecimento das duas vias distintas da carcinogénese urotelial. Este conhecimento constitui um importante avanço na compreensão da patologia molecular da doença e abre a possibilidade de intervenção terapêutica personalizada. O conhecimento gerado pela aplicação de sofisticadas ferramentas genómicas, proteómicas, das ciências computacionais e estatísticas oferece-nos a possibilidade de *assimilar* os dados existentes na aplicação biomarcadores diagnósticos e prognósticos que podem ser validados em estudos retrospectivos e prospetivos.

Procuramos, na perspetiva do nosso estudo, integrar o estadiamento convencional com os resultados do estudo da expressão de biomarcadores nos tumores uroteliais com o

objetivo de caracterizar padrões preditivos da recorrência, progressão e mortalidade específica da doença e refinar a tomada de decisão clínica na seleção da terapêutica. Especificamente, o nosso estudo mostra que a *graduação* do fenótipo molecular é viável e estratifica os doentes com CUBNMI em categorias prognósticas potencialmente preditivas da evolução clínica, nomeadamente na identificação do subgrupo de doentes com pior prognóstico. Neste grupo de doentes com CUBNMI de alto grau e que, simultaneamente, exibem um fenótipo molecular luminal, a evolução clínica mostra a progressão da doença que será causa da morte em todos os doentes da coorte por nós estudada. Mostramos que, por um lado, este *modelo* identifica os casos de evolução fatal entre os doentes com um risco mais elevado atribuído pela aplicação de *fatores clássicos*, mostrando um subgrupo de doentes *refratário* ao tratamento convencional. Claro que todos estes resultados carecem de confirmação em estudos prospetivos.

Os resultados que obtivemos no nosso estudo, mesmo com as limitações metodológicas que reconhecemos, motiva-nos para a realização de um estudo prospetivo que, aliás, já está em curso na Fundação Champalimaud, em doentes com CUBNMI para verificar se a classificação do fenótipo molecular continua a ser preditora do comportamento clínico.

Em conclusão, o nosso estudo mostra que a *graduação* do fenótipo molecular é viável e estratifica os doentes com CUBNMI em categorias prognósticas potencialmente preditivas de recorrência, progressão e morte específica pela doença. Adiciona informações ao resultado da classificação morfológica que resulta dos fatores de prognóstico clássicos como o estágio e o grau histopatológico, particularmente no tumores de alto grau. O potencial de deteção de doentes com CUBNMI com perfil preditivo de resposta otimizada à quimioterapia intravesical/quimioterapia citotóxica (tipo basal) ou capazes de responder à terapêutica-alvo (luminal) requer investigação adicional.

Todos estes avanços na classificação molecular encerram o potencial de melhorar e personalizar o atendimento clínico dos doentes com CUBNMI.

8. Bibliografia

8. Bibliografia

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Ahmedin J. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;(68):394–424.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133–45.
3. Miranda N, Portugal C, Nogueira PJ, Farinha CS, Soares A, Alves MI, et al. Portugal - Doenças Oncológicas em números – 2014. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Lisboa; 2014. 85 p.
4. Miranda N, Portugal C. PORTUGAL Doenças Oncológicas em Números – 2015. Lisboa; 2016.
5. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama*. 2011;306(7):737–45.
6. Islami F, Goding Sauer A, Miller KD, Siegel RL, Fedewa SA, Jacobs EJ, et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer J Clin*. 2018;00(68):31–54.
7. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63:234–41.
8. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315–30.
9. Yeung C, Dinh T, Lee J. The Health Economics of Bladder Cancer: An Updated Review of the Published Literature. *Pharmacoeconomics*. 2014;32(11):1093–104.
10. Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witjes JA. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2016;69(3):438–47.
11. Lopez-Beltran A. Bladder cancer: Clinical and pathological profile. *Scand J Urol Nephrol*. 2008;42(s218):95–109.
12. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2016;70(1):106–19.
13. Olsson H, Hultman P, Monsef N, Rosell J, Jahnson S. Immunohistochemical Evaluation of Cell Cycle Regulators: Impact on Predicting Prognosis in Stage T1 Urinary Bladder Cancer. *ISRN Urol*. 2012;2012:1–7.
14. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 2000;100:57–70.
15. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74.
16. Pan C-C. The value of molecular markers in classification and prediction of progression in non-muscle-invasive bladder cancer. *Transl Androl Urol*. 2018;7(4):736–9.
17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
18. Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell-Walsh Urology: Expert Consult Premium Edition: Enhanced Online Features and Print, 4-Volume Set. 2011.

19. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta; 2015.
20. Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen receptor signaling in bladder cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(2):1–14.
21. Daugherty SE, Lacey J V., Pfeiffer RM, Park Y, Hoover RN, Silverman DT. Reproductive factors and menopausal hormone therapy and bladder cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J Cancer*. 2013;133(2):462–72.
22. Miyamoto H, Yang Z, Chen Y-T, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, et al. Promotion of Bladder Cancer Development and Progression by Androgen Receptor Signals. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2007;99(7):558–68.
23. Yee DS, Ishill NM, Lowrance WT, Herr HW, Elkin EB. Ethnic differences in bladder cancer survival. *Urology*. Elsevier Inc.; 2011;78(3):544–9.
24. Kakehi Y, Hirao Y, Kim W-J, Ozono S, Masumori N, Miyanaga N, et al. Bladder Cancer Working Group Report. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(Supplement 1):i57–64.
25. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep*. 2018;8(1):1129.
26. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimate Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer. 2012.
27. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2017;71(1):96–108.
28. Schmitz-Dräger BJ, Droller M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, Van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: The WHO/ICUD consensus. *Urol Int*. 2015;94(1):1–24.
29. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, et al. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2014;311(2):183–92.
30. World Health Organization. Mortality attributable of tobacco: WHO Global Report. WHO Libr Cat Data. 2012;4.
31. Kauppinen T, Toikkanen J, Pedersen D, Young R, Kogevinas M, Ahrens W, et al. Carex Occupational exposure to carcinogens in the European Union in 1990-93. *Victoria*. 1998;(February 1995):10–8.
32. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny L a. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*. 2009;27(3):289–93.
33. Zlatev D V., Altobelli E, Liao JC. Advances in imaging technologies in the evaluation of high-grade bladder cancer. *Urol Clin North Am*. Elsevier Inc; 2015;42(2):147–57.
34. Ramírez-Backhaus M, Domínguez-Escrig J, Collado A, Rubio-Briones J, Solsona E. Restaging transurethral resection of bladder tumor for high-risk stage Ta and T1 bladder cancer. *Curr Urol Rep*. 2012;13(2):109–14.
35. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, et al. An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2009;56(2):247–56.
36. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BWG, Compérat EM, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2013;64(4):447–61.
37. Babjuk M, Bohle A, Burger. Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta,T1 and CIS). *Eur Urol*. 2015;1.

38. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol.* 2009;27(3):295–300.
39. Grasso M. Bladder Cancer: A Major Public Health Issue. *Eur Urol Suppl.* 2008;7(7):510–5.
40. Figueroa JD, Han SS, Garcia-Closas M, Baris D, Jacobs EJ, Kogevinas M, et al. Genome-wide interaction study of smoking and bladder cancer risk. *Carcinogenesis.* 2014;35(8):1737–44.
41. Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma. *Int J Urol.* 2017;24(10):730–4.
42. Hemminki K, Bermejo JL, Ji J, Kumar R. Familial bladder cancer and the related genes. *Curr Opin Urol.* 2011;21(5):386–92.
43. Kiemeny LA, Sulem P, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G, et al. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet.* 2010;42(5):415–9.
44. Pesch B, Gawrych K, Rabstein S, Weiss T, Casjens S, Rihs HP, et al. N-acetyltransferase 2 phenotype, occupation, and bladder cancer risk: Results from the EPIC cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(11):2056–65.
45. Marcus PM, Vineis P, Rothman N. NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: A meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. *Pharmacogenetics.* 2000;10(2):115–22.
46. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: Results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 2005;366(9486):649–59.
47. Pavanello S, Mastrangelo G, Placidi D, Campagna M, Pulliero A, Carta A, et al. CYP1A2 polymorphisms, occupational and environmental exposures and risk of bladder cancer. *Eur J Epidemiol.* 2010;25(7):491–500.
48. Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, Foster RS, Khan KNM, Masferrer JL, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res.* 1999;59(22):5647–50.
49. Kömhoff M, Guan Y, Shappell HW, Davis L, Jack G, Shyr Y, et al. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *Am J Pathol.* 2000;157(1):29–35.
50. Shan Y, Zhang L, Bao Y, Li B, He C, Gao M, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a novel target of sulforaphane via COX-2/MMP2, 9/Snail, ZEB1 and miR-200c/ZEB1 pathways in human bladder cancer cells. *J Nutr Biochem. Elsevier Inc.;* 2013;24(6):1062–9.
51. Czachorowski MJ, Amaral AFS, Montes-Moreno S, Lloreta J, Carrato A, Tardón A, et al. Cyclooxygenase-2 Expression in Bladder Cancer and Patient Prognosis: Results from a Large Clinical Cohort and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2012;7(9):e45025.
52. Freedman ND. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *Jama.* 2011;306(7):737.
53. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: A controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(7):767–90.
54. Rink M, Crivelli JJ, Shariat SF, Chun FK, Messing EM, Soloway MS. Smoking and Bladder Cancer: A Systematic Review of Risk and Outcomes. *Eur Urol Focus. European Association of Urology;* 2015;1(1):17–27.
55. Baris D, Karagas MR, Verrill C, Johnson A, Andrew AS, Marsit CJ, et al. A case-control study of smoking and bladder cancer risk: Emergent patterns over time. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(22):1553–61.

56. Letašiová S, Medvedová A, Šovčíková A, Dušinská M, Volkovová K, Mosoiu C, et al. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Heal*. 2012;11(Suppl 1):S11.
57. Rushton L, Hutchings SJ, Fortunato L, Young C, Evans GS, Brown T, et al. Occupational cancer burden in Great Britain. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2012;107 Suppl(SUPPL. 1):S3-7.
58. Zeegers MPA, Swaen GMH, Kant I, Goldbohm RA, Van den Brandt PA. Occupational risk factors for male bladder cancer: Results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med*. 2001;58(9):590–6.
59. Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. Elsevier Inc.; 2012;30(2):199–211.
60. Case R, Hosker ME. Tumour of the urinary bladder as an occupational disease in the rubber industry in England and Wales. *Br J Prev Soc Med*. 1954;8(2):39–50.
61. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett*. 2010;193(2):131–7.
62. Ferrís J, Garcia J, Berbel O, Ortega JA. Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. 2016;37(8):513–22.
63. Fernández MI, López JF, Vivaldi B, Coz F. Long-Term Impact of Arsenic in Drinking Water on Bladder Cancer Health Care and Mortality Rates 20 Years After End of Exposure. *JURO*. Elsevier Inc.; 2012;187(3):856–61.
64. Karagas MR, Andrew AS, Nelson HH, Li Z, Punshon T, Schned A, et al. SLC39A2 and FSIP1 polymorphisms as potential modifiers of arsenic-related bladder cancer. *Hum Genet*. 2012;131(3):453–61.
65. Tsuji JS, Alexander DD, Perez V, Mink PJ. Arsenic exposure and bladder cancer: Quantitative assessment of studies in human populations to detect risks at low doses. *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;317(1):17–30.
66. Ros MM, Bas Bueno-De-Mesquita HB, Büchner FL, Aben KKH, Kampman E, Egevad L, et al. Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2011 Jun 1;128(11):2695–708.
67. Michaud DS, Kogevinas M, Cantor KP, Villanueva CM, Garcia-closas M, Rothman N, et al. Total Fluid and Water Consumption and the Joint Effect of Exposure to Disinfection By-Products on Risk of Bladder Cancer. 2007;115(11):1569–72.
68. Villanueva CM, Cantor KP, King WD, Jaakkola JJK, Cordier S, Lynch CF, et al. Total and specific fluid consumption as determinants of bladder cancer risk.
69. Berwick M. Fluid intake and the risk of tumor recurrence in patients with superficial bladder cancer. 2003;170(November):1777–80.
70. Adonina CÆ, Real FX, Dosemeci AEM, Kogevinas AEM. Coffee consumption , genetic susceptibility and bladder cancer risk. 2009;121–7.
71. Lotan Y, Goodman PJ, Youssef RF, Svatek RS, Shariat SF, Tangen CM, et al. Evaluation of Vitamin E and Selenium Supplementation for the Prevention of Bladder Cancer in SWOG Coordinated SELECT. *JURO*. Elsevier Inc.; 2012;187(6):2005–10.
72. Romani M, Pistillo MP, Banelli B. Environmental Epigenetics: Crossroad between Public Health, Lifestyle, and Cancer Prevention. *Biomed Res Int*. 2015;2015:587983.
73. Jordan P, Webbe G, Sturrock F. Human schistosomiasis. *CAB Int Oxon*. 1993;
74. Salem HK, Mahfouz S. Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of Schistosoma-associated bladder cancer in Egypt in the past decade. *Urology*. Elsevier Inc.; 2012;79(2):379–83.

75. Abern MR, Dude AM, Tsivian M, Coogan CL. The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* Elsevier Inc.; 2013;31(8):1628–34.
76. Zelefsky MJ, Housman DM, Pei X, Alicikus Z, Magsanoc JM, Dauer LT, et al. Incidence of secondary cancer development after high-dose intensity-modulated radiotherapy and image-guided brachytherapy for the treatment of localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Elsevier Inc; 2012;83(3):953–9.
77. Pearson RM, Soloway MS. Does cyclophosphamide induce bladder cancer? *Urology.* 1978;11(5):437–47.
78. Fernandes ET, Manivel JC, Reddy PK, Ercole CJ. Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases. *J Urol.* 1996;156(6):1931–3.
79. MacKenzie T, Zens MS, Ferrara A, Schned A, Karagas MR. Diabetes and risk of bladder cancer. *Cancer.* 2011;117(7):1552–6.
80. Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP, et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care.* 2011;34(4):916–22.
81. Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Physiol.* 2000;278(6):F867–74.
82. Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* Elsevier Inc.; 2010;28(4):401–8.
83. Apodaca G. The uroepithelium: Not just a passive barrier. *Traffic.* 2004;5(3):117–28.
84. Schaafsma HE, Ramaekers FC, van Muijen GN, Lane EB, Leigh IM, Robben H, et al. Distribution of cytokeratin polypeptides in human transitional cell carcinomas, with special emphasis on changing expression patterns during tumor progression. *Am J Pathol.* 1990;136(2):329–43.
85. Kreft ME, Hudoklin S, Jezernik K, Romih R. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma.* 2010;246(1):3–14.
86. Afonso J, Freitas R, Lobo F, Morais a., Amaro T, Reis R, et al. Evolving hallmarks in urothelial bladder cancer: unveiling potential biomarkers. *Acta Urológica Port. Associação Portuguesa de Urologia;* 2015;32(1):1–11.
87. Bolenz C, Lotan Y. Transitional research in bladder cancer: From molecular pathogenesis to useful tissue biomarkers. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(5):407–15.
88. Hanahan D, Weinberg R a, Francisco S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 2000;100:57–70.
89. Garrett MD. Cell cycle control and cancer. *Curr Sci.* 2001;81(5):515–22.
90. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274(5293):1672–7.
91. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology*, Fourth Edition. 2013.
92. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004;432(7015):316–23.
93. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408(6810):307–10.
94. Chow AY. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nat Educ.* 2010;(3(9)):7.
95. Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol.* Elsevier Inc.; 2011;42(4):455–81.

96. Matsushita K, Cha EK, Matsumoto K, Baba S, Chromecki TF, Fajkovic H, et al. Immunohistochemical biomarkers for bladder cancer prognosis. *Int J Urol*. 2011 Sep;18(9):616–29.
97. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):713–25.
98. Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: Practical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(6):844–52.
99. Cheng L, Davidson DD, Maclennan GT, Williamson SR, Zhang S, Koch MO, et al. The origins of urothelial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(6):865–80.
100. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim*. Macmillan Publishers Limited; 2017;3:1–19.
101. LInnenbach AJ, Pressler LB, A.seng B, Kimmel BS, E.tomaszewski J, Malkowicz SB. Characterization of chromosome 9 deletions in transitional cell carcinoma by microsatellite assay. *Hum Mol Genet*. 1993;2(9):1407–11.
102. Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J, Knowles MA. P16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet*. 1995;4(9):1569–77.
103. Berggren P, Kumar R, Sakano S, Hemminki L, Wada T, Steineck G, et al. Detecting Homozygous Deletions in the CDKN2A(p16INK4a)/ARF(p14ARF) Gene in Urinary Bladder Cancer Using Real-Time Quantitative PCR. *Clin Cancer Res*. 2003;9(1):235–42.
104. Munday R, Mhawech-Fauceglia P, Munday CM, Paonessa JD, Tang L, Munday JS, et al. Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by broccoli sprouts. *Cancer Res*. 2008;68(5):1593–600.
105. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):731–7.
106. Nordentoft I, Lamy P, Birkenkamp-Demtröder K, Shumansky K, Vang S, Hornshøj H, et al. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Rep*. 2014;7(5):1649–63.
107. Balbás-Martínez C, Sagrera A, Carrillo-De-Santa-Pau E, Earl J, Márquez M, Vazquez M, et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet*. 2013;45(12):1464–9.
108. Weinstein JN, Akbani R, Broom BM, Wang W, Verhaak RGWW, McConkey D, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. Nature Publishing Group; 2014;507(7492):315–22.
109. Hurst CD, Platt FM, Taylor CF, Knowles MA. Novel tumor subgroups of urothelial carcinoma of the bladder defined by integrated genomic analysis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5865–77.
110. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer : new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Publ Gr*. 2015;15(1):25–41.
111. Chow NH, Cairns P, Eisenberger CF, Schoenberg MP, Taylor DC, Epstein JI, et al. Papillary urothelial hyperplasia is a clonal precursor to papillary transitional cell bladder cancer. *Int J Cancer*. 2000;89(6):514–8.
112. Junker K, van Oers JMM, Zwarthoff EC, Kania I, Schubert J, Hartmann A. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutations in Bladder Tumors Correlate with Low Frequency of Chromosome Alterations. *Neoplasia*. Neoplasia Press, Inc.; 2008;10(1):1–7.
113. Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand J Urol Nephrol*. 2008;42(SUPPL.218):154–65.
114. Van Rhijn BWG, Montironi R, Zwarthoff EC, Jöbsis AC, Van Der Kwast TH. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol*. 2002;198(2):245–51.

115. Mitra AP, Cote RJ. Molecular Pathogenesis and Diagnostics of Bladder Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2009;4(1):251–85.
116. Czerniak B. Molecular pathology and biomarkers of bladder cancer. *Transl Pathol Early Cancer.* 2012;9:159–76.
117. Bakkar AA. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 2003;63:8108–12.
118. Birkhahn M, Mitra AP, Williams AJ, Lam G, Ye W, Datar RH, et al. Predicting Recurrence and Progression of Noninvasive Papillary Bladder Cancer at Initial Presentation Based on Quantitative Gene Expression Profiles. *Eur Urol.* 2010;57(1):12–20.
119. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene.* 2005;24(33):5218–25.
120. Casey RG, Catto JWF, Cheng L, Cookson MS, Herr H, Shariat S, et al. Diagnosis and management of urothelial carcinoma in situ of the lower urinary tract: A systematic review. *Eur Urol. European Association of Urology;* 2015;67(5):876–88.
121. Sfakianos JP, Lin Gellert L, Maschino A, Gotto GT, Kim PH, Al-Ahmadie H, et al. The role of PTEN tumor suppressor pathway staining in carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2014;32(5):657–62.
122. Zhang Z-T, Pak J, Shapiro E, Sun T-T, Wu X-R. Urothelium-specific expression of an oncogene in transgenic mice induced the formation of carcinoma in situ and invasive transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59(14):3512–7.
123. Puzio-kuter AM, Castillo-martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer service Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. 2009;(212):675–80.
124. Gao J, Huang HY, Pak J, Cheng J, Zhang ZT, Shapiro E, et al. p53 deficiency provokes urothelial proliferation and synergizes with activated Ha-ras in promoting urothelial tumorigenesis. *Oncogene.* 2004;23(3):687–96.
125. Bartsch G, Mitra AP, Cote RJ. Expression profiling for bladder cancer: Strategies to uncover prognostic factors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010;10(12):1945–54.
126. Gordon GM, Du W. Conserved RB functions in development and tumor suppression. *Protein Cell.* 2011;2(11):864–78.
127. Hartmann A, Schlake G, Hofstaedter F, Knuechel R, Zaak D, Hungerhuber E, et al. Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res.* 2002;62(3):809–18.
128. Smith ND, Rubenstein JN, Eggner SE, Kozlowski JM. The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. *J Urol.* 2003;169(4):1219–28.
129. George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, et al. p53 Gene and Protein Status: The Role of p53 Alterations in Predicting Outcome in Patients With Bladder Cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(34):5352–8.
130. Frezza C, Martins CP. From tumor prevention to therapy: Empowering p53 to fight back. *Drug Resist Updat. Elsevier Ltd;* 2012;15(5–6):258–67.
131. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, et al. Progression in Bladder Cancer. 1998;90(14).
132. Macaluso M, Montanari M, Giordano A. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene.* 2006;25(38):5263–7.
133. Calzone L, Gelay A, Zinovyev A, Radvanyi F, Barillot E. A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway. *Mol Syst Biol.* 2008;4(173):1–12.

134. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, et al. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(6):1014–24.
135. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(6):1007–13.
136. Lu M, Wikman F, Orntoft TF, Methods A, Charytonowicz E. Impact of Alterations Affecting the p53 Pathway in Bladder Cancer on Clinical Outcome , Assessed by Conventional and Array-based Methods Impact of Alterations Affecting the p53 Pathway in Bladder Cancer on Clinical Outcome , Assessed by Conventional and. 2002;8(January):171–9.
137. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: New insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol.* 2006;24(35):5552–64.
138. Cheng L, Gu J, Ulbright TM, MacLennan GT, Sweeney CJ, Zhang S, et al. Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor. *Cancer.* 2002;94(1):104–10.
139. Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 Years of molecular genetic studies. *Int J Cancer.* 2002;101(1):1–6.
140. Majewski T, Lee S, Jeong J, Yoon D-S, Kram A, Kim M-S, et al. Understanding the development of human bladder cancer by using a whole-organ genomic mapping strategy. *Lab Investig.* 2008;88(7):694–721.
141. Kram A, Li L, Zhang RD, Yoon DS, Ro JY, Johnston D, et al. Mapping and genome sequence analysis of chromosome 5 regions involved in bladder cancer progression. 2001;2001/07/17(7):1039–48.
142. Volkmer J-P, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova A V., et al. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(6):2078–83.
143. Van Batavia J, Yamany T, Molotkov A, Dan H, Mansukhani M, Batourina E, et al. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):982–91.
144. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14016–21.
145. Gui-Zhong L, Li-Bo M. Bladder cancer in individuals with spinal cord injuries: A meta-analysis. *Spinal Cord.* 2017;55(4):341–5.
146. Manunta A, Vincendeau S, Kiriakou G, Lobel B, Guillé F. Non-transitional cell bladder carcinomas. *BJU Int.* 2005;95(4):497–502.
147. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998 Dec;22(12):1435–48.
148. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Böhle A, Palou J, Buckley R, et al. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *Eur Urol Suppl.* 2008;7(10):618–26.
149. Reuter VE, Argani P, Zhou M, Delahunt B. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the kidney tumors: report from the international society of urologic pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):e35-49.

150. Compérat EM, Burger M, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, Rouprêt M, et al. Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016." *Eur Urol Focus*. 2018;1–10.
151. Varinot J, Furudoï A, Rouporet M, Compérat E. Mise au point sur les classifications moléculaires et la nouvelle classification histologique du cancer de la vessie. *Progrès en Urol*. Elsevier Masson SAS; 2016;26(11–12):600–7.
152. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE, Catto J. Platinum Priority – Guidelines The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs — Part B : Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2016;70(1):106–19.
153. Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *World Heal Organ Classification Tumours*. European Association of Urology; 2004;ARC Press.(1):217–78.
154. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2009;374(9685):239–49.
155. Rubben H, Lutzeyer W, Fischer N, Deutz F, Lagrange W, Giani G, et al. Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors. *J Urol*. 1988;139(2):283–5.
156. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours - 8th edition. *Union Int Cancer Control*. 2017;241.
157. Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, et al. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer : AUA / SUO Guideline. *J Urol*. Elsevier Ltd; 2016;196(4):1–9.
158. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes J a., Jakse G, Nonomura N, Cheng C, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*. 2005;66(6):90–107.
159. Paner GP, Montironi R, Amin MB. Challenges in Pathologic Staging of Bladder Cancer: Proposals for Fresh Approaches of Assessing Pathologic Stage in Light of Recent Studies and Observations Pertaining to Bladder Histoanatomic Variances. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(3):113–27.
160. Sylvester RJ, van der Meijden APMM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, et al. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. *Eur Urol*. 2006;49(3):466–77.
161. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñero L, Gonzalez M, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol*. 2009 Nov;182(5):2195–203.
162. Đug H, Jagodić S, Ahmetović-Đug J, Selimović Z, Sulejmanović A. Predicting recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer after transurethral resection. 2016;13(August 2015):56–61.
163. May M, Brookman-Amissah S, Roigas J, Hartmann A, Störkel S, Kristiansen G, et al. Prognostic Accuracy of Individual Uropathologists in Noninvasive Urinary Bladder Carcinoma: A Multicentre Study Comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation Classifications. *Eur Urol*. 2010;57(5):850–8.
164. Van Rhijn BWG, Van Der Kwast TH, Kakiashvili DM, Fleshner NE, Van Der Aa MNM, Alkhateeb S, et al. Pathological stage review is indicated in primary pT1 bladder cancer. *BJU Int*. 2010;106(2):206–10.
165. Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Holmberg E, Busch C, Johansson SL. Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol*. 1999;162(3 I):702–7.

166. D'Andrea D, Abufaraj M, Susani M, Ristl R, Foerster B, Kimura S, et al. Accurate prediction of progression to muscle-invasive disease in patients with pT1G3 bladder cancer: A clinical decision-making tool. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. Elsevier; 2018;1–7.
167. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Carrasco JC, et al. Prognostic Factors in Stage T1 Grade 3 Bladder Cancer Survival: The Role of G1-S Modulators (p53, p21Waf1, p27kip1, Cyclin D1, and Cyclin D3) and Proliferation Index (ki67-MIB1). *Eur Urol*. 2004;45(5):606–12.
168. Gontero P, Sylvester R, Pisano F, Joniau S, Vander Eeckt K, Serretta V, et al. Prognostic factors and risk groups in T1G3 non-muscle-invasive bladder cancer patients initially treated with bacillus calmette-guérin: Results of a retrospective multicenter study of 2451 patients. *Eur Urol*. 2015;67(1):74–82.
169. Mulder AH, Van Hootegem JCSP, Sylvester R, Kate FJWT, Kurth KH, Ooms ECM, et al. Prognostic factors in bladder carcinoma: Histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J Pathol*. 1992;166(1):37–43.
170. Lopezbeltran a, Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-Invasive Urothelial Neoplasms: According to the Most Recent WHO Classification. *Eur Urol*. 2004;46(2):170–6.
171. Cheng L, Zhang S, Davidson D, MacLennan G, Koch M, Montironi R L-BA. Molecular determinants of tumor recurrence in the urinary bladder. *Futur Oncol*. 2009;5(6):843–57.
172. Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, Aine M, Höglund M, Kim WY, et al. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol*. 2017;72(3):354–65.
173. Czerniak B, Dinney C, McConkey D. Origins of Bladder Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11(February):149–74.
174. Sikic D, Keck B, Wach S, Taubert H, Wullich B, Goebell PJ, et al. Immunohistochemical subtyping using CK20 and CK5 can identify urothelial carcinomas of the upper urinary tract with a poor prognosis. *PLoS One*. 2017;12(6):1–13.
175. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(8):3110–5.
176. McConkey DJ, Choi W, Dinney CPN. New insights into subtypes of invasive bladder cancer: Considerations of the clinician. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2014;66(4):609–10.
177. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*. The Authors; 2016;12:105–17.
178. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. Nature Publishing Group; 2014;11(7):400–10.
179. Patschan O, Sjodahl G, Chebil G, Lovgren K, Lauss M, Gudjonsson S, et al. A molecular pathologic framework for risk stratification of stage T1 urothelial carcinoma. *Eur Urol*. 2015;68(5):824–32.
180. Otto W, Breyer J, Wirtz R, Hartmann A, Porubsky S, Nitschke K, et al. mRNA-Expression of KRT5 and KRT20 Defines Distinct Prognostic Subgroups of Muscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer Correlating with Histological Variants. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3396.
181. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell*. Elsevier Inc.; 2014;25(2):152–65.

182. Mishriki SF, Nabi G, Cohen NP. Diagnosis of Urologic Malignancies in Patients with Asymptomatic Dipstick Hematuria: Prospective Study with 13 Years' Follow-up. *Urology*. 2008;71(1):13–6.
183. Edwards TJ, Dickinson AJ, Gosling J, McInerney PD, Natale S, McGrath JS. Patient-specific risk of undetected malignant disease after investigation for haematuria, based on a 4-year follow-up. *BJU Int*. 2011;107(2):247–52.
184. Lotan Y. Promises and challenges of fluorescence cystoscopy. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. Elsevier; 2015;33(6):261–4.
185. Naito S, Algaba F, Babjuk M, Bryan RT, Sun YH, Valiquette L, et al. The Clinical Research Office of the Endourological Society (CROES) Multicentre Randomised Trial of Narrow Band Imaging–Assisted Transurethral Resection of Bladder Tumour (TURBT) Versus Conventional White Light Imaging–Assisted TURBT in Primary Non–Muscle-. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2016;70(3):506–15.
186. Cauberg ECC, Kioen S, Visser M, De La Rosette JJMCH, Babjuk M, Soukup V, et al. Narrow band imaging cystoscopy improves the detection of nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urology*. Elsevier Inc.; 2010;76(3):658–63.
187. Zheng C, Lv Y, Zhong Q, Wang R, Jiang Q. Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer: systematic review and meta-analysis. *BJU Int*. 2012;110(11 Pt B):E680–7.
188. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;33:53–104.
189. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009;22 Suppl 2(October 2008):S53–9.
190. Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebre T, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: Summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol*. 2014;65(4):778–92.
191. Ather MH, Nazim SM. New and contemporary markers of prognosis in nonmuscle invasive urothelial cancer. *Korean J Urol*. 2015;56(8):553–64.
192. Cowan NC, Santis M De, Witjes JA, Lebre T, Compe EM, Espino EL, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. 2017;71:462–75.
193. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am*. 1992 Aug;19(3):499–508.
194. Divrik RT, Yildirim Ü, Zorlu F, Özen H. The Effect of Repeat Transurethral Resection on Recurrence and Progression Rates in Patients With T1 Tumors of the Bladder Who Received Intravesical Mitomycin: A Prospective, Randomized Clinical Trial. *J Urol*. 2006;175(5):1641–4.
195. Herr HW. Role of Re-Resection in Non – Muscle-Invasive Bladder Cancer. 2011;13(8):283–8.
196. Divrik RT, Ahin AF, Yildirim Ü, Altok M, Zorlu F. Impact of routine second transurethral resection on the long-term outcome of patients with newly diagnosed pT1 urothelial carcinoma with respect to recurrence, progression rate, and disease-specific survival: A prospective randomised clinical trial. *Eur Urol*. 2010;58(2):185–90.
197. Brausi M, Collette L, Kurth K, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol*. 2002 May;41(5):523–31.
198. Perlis N, Zlotta AR, Beyene J, Finelli A, Fleshner NE, Kulkarni GS. Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-muscle-invasive bladder cancer recurrences: An updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2013;64(3):421–30.

199. Böhle A. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *Int Braz J Urol.* 2004;30(4):353–4.
200. Brocks CP, Büttner H, Böhle A. Inhibition of Tumor Implantation By Intravesical Gemcitabine in a Murine Model of Superficial Bladder Cancer. *J Urol.* 2005 Sep;174(3):1115–8.
201. Solsona E, Madero R, Chantada V, Fernandez JM, Zabala JA, Portillo JA, et al. Sequential combination of mitomycin C plus bacillus calmette-guérin (BCG) is more effective but more toxic than BCG alone in patients with non-muscle-invasive bladder cancer in intermediate- and high-risk patients: Final outcome of CUETO 93009, a randomiz. *Eur Urol.* 2015;67(3):508–16.
202. Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, Hoeltl W, Calais Da Silva F, Powell PH, et al. Long-Term Efficacy Results of EORTC Genito-Urinary Group Randomized Phase 3 Study 30911 Comparing Intravesical Instillations of Epirubicin, Bacillus Calmette-Guérin, and Bacillus Calmette-Guérin plus Isoniazid in Patients with Intermediate- and High-Risk . *Eur Urol. European Association of Urology;* 2010;57(5):766–73.
203. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, Van Andel G, et al. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Gu??rin. *Eur Urol. European Association of Urology;* 2016;69(1):60–9.
204. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent Ta, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: A randomized Southwest Oncology Group study. *J Urol.* 2000;163(4):1124–9.
205. Kamat AM, Sylvester RJ, Böhle A, Palou J, Lamm DL, Brausi M, et al. Definitions, end points, and clinical trial designs for non-muscle-invasive bladder cancer: Recommendations from the International Bladder Cancer Group. *J Clin Oncol.* 2016;34(16):1935–44.
206. Ficarra V, Novara G, Ahlering TE, Costello A, Eastham JA, Graefen M, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Studies Reporting Potency Rates After Robot-assisted Radical Prostatectomy. 2012;62:418–30.
207. Bruins HM, Veskimäe E, Hernandez V, Imamura M, Neuberger MM, Dahm P, et al. The Impact of the Extent of Lymphadenectomy on Oncologic Outcomes in Patients Undergoing Radical Cystectomy for Bladder Cancer : A Systematic Review. 2014;66:1065–77.
208. Stein BJP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng A, Boyd S, et al. Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer : Long-Term Results in 1054 Patients. 2011;19(3):666–75.
209. Sonpavde G, Sternberg CN. Neoadjuvant Chemotherapy for Invasive Bladder Cancer. 2012;136–46.
210. Van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and Progression of Disease in Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy. *Eur Urol.* 2009;56(3):430–42.
211. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.* 2005;66(6 SUPPL. 1):4–34.
212. Mazzucchelli R, Cheng L, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R. Classification and grading of noninvasive and invasive neoplasms of the urothelium. *Anal Quant Cytol Histol.* 2012;34(3):111–9.

213. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Ojea A, et al. The EORTC Tables Overestimate the Risk of Recurrence and Progression in Patients with Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated with Bacillus Calmette-Guérin: External Validation of the EORTC Risk Tables. *Eur Urol*. 2011 Sep;60(3):423–30.
214. Lopez-Beltran A, Bassi P, Pavone-Macaluso M, Montironi R. Handling and Pathology Reporting of Specimens with Carcinoma of the Urinary Bladder, Ureter, and Renal Pelvis. *Eur Urol*. 2004;45(3):257–66.
215. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmäng S, Lee R, Kim SP, Stenzl A, et al. The economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol*. 2014;66(2):253–62.
216. Woldu SL, Bagrodia A, Lotan Y. Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*. 2017;119(3):371–80.
217. Cheng L, Neumann RM, Weaver AL, Spotts BE, Bostwick DG. Predicting cancer progression in patients with stage T1 bladder carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999 Oct;17(10):3182–7.
218. Cheng L, Davison DD, Adams J, Lopez-Beltran A, Wang L, Montironi R, et al. Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;89(1):73–111.
219. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
220. Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. *Clin Proteomics*. 2013;10(1).
221. Duffy MJ, Crown J. Companion biomarkers: paving the pathway to personalized treatment for cancer. *Clin Chem*. 2013;59(10):1447–56.
222. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol*. Elsevier B.V; 2012;6(2):140–6.
223. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008;452(7187):548–52.
224. Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: How biomarkers can help. *Clin Chem*. 2008;54(11):1770–9.
225. Duffy MJ, Crown J. Precision treatment for cancer: Role of prognostic and predictive markers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(1):30–45.
226. Duffy MJ, O'Donovan N, Crown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat Rev*. Elsevier Ltd; 2011;37(2):151–9.
227. La Thangue NB, Kerr DJ. Predictive biomarkers: A paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Publishing Group; 2011;8(10):587–96.
228. August J. Market watch: Emerging companion diagnostics for cancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group; 2010;9(5):351.
229. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):2020–7.
230. Cheng HL, Chow NH, Tzai TS, Tong YC, Lin JS, Chan SH, et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Anticancer Res*. 1997 Jan;17(4A):2789–93.
231. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, et al. Multi-Institutional Validation of the Predictive Value of Ki-67 Labeling Index in Patients With Urinary Bladder Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2009;101(2):114–9.
232. Blanchet P, Droupy S, Eschwege P, Viellefond A, Paradis V, Pichon MF, et al. Prospective evaluation of Ki-67 labeling in predicting the recurrence and progression of superficial bladder transitional cell carcinoma. *Eur Urol*. Karger Publishers; 2001 Aug 19;40(2):169–75.

233. Bertz S, Otto W, Denzinger S, Wieland WF, Burger M, Stöhr R, et al. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2014;65(1):218–26.
234. Bryan RT, Zeegers MP, James ND, Wallace DM a., Cheng KK. BJUI Biomarkers in bladder cancer. *BJU Int*. 2009;105(5):608–13.
235. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, et al. Altered Expression of the Retinoblastoma Gene Product: Prognostic Indicator in Bladder Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1992 Aug 19;84(16):1251–6.
236. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Predictive Value of Cell Cycle Biomarkers in Nonmuscle Invasive Bladder Transitional Cell Carcinoma. *J Urol*. 2007;177(2):481–7.
237. Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Fariñas S, López-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E, et al. Molecular and Immunohistochemical Analysis of the Prognostic Value of Cell-Cycle Regulators in Urothelial Neoplasms of the Bladder. *Eur Urol*. 2006;50(3):506–15.
238. Alexander RE, Williamson SR, Richey J, Lopez-Beltran A, Montironi R, Davidson DD, et al. The Expression Patterns of p53 and p16 and an Analysis of a Possible Role of HPV in Primary Adenocarcinoma of the Urinary Bladder. *PLoS One*. 2014;9(4):e95724.
239. Schulz W a. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer*. 2006;119(7):1513–8.
240. Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol*. 2013;63(1):4–15.
241. Shariat SF, Bolenz C, Godoy G, Fradet Y, Ashfaq R, Karakiewicz PI, et al. Predictive Value of Combined Immunohistochemical Markers in Patients With pT1 Urothelial Carcinoma at Radical Cystectomy. *J Urol*. American Urological Association; 2009;182(1):78–84.
242. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Jan 6;85(1):53–9.
243. Shariat SF, Chade DC, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, et al. Combination of Multiple Molecular Markers Can Improve Prognostication in Patients With Locally Advanced and Lymph Node Positive Bladder Cancer. *J Urol*. Elsevier Inc.; 2010;183(1):68–75.
244. Shariat SF, Zlotta AR, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness. *Mod Pathol*. 2007;20(4):445–59.
245. Kamai T, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H, Yoshida KI. Decreasing of p27(Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer*. 2001;84(9):1242–51.
246. Franke KH, Miklosi M, Goebell P, Clasen S, Steinhoff C, Anastasiadis AG, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor P27(KIP1) is expressed preferentially in early stages of urothelial carcinoma. *Urology*. 2000;56(4):689–95.
247. Jong Kyong KIM, Alan Diehl J. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol*. 2009;220(2):292–6.
248. Lopez-Beltran A, Requena MJ, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Blanca AM, et al. Cyclin D3 expression in primary Ta/T1 bladder cancer. *J Pathol*. 2006;209(1):106–13.
249. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Requena MJ, et al. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: The role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(3):444–52.

250. Lopez-Beltran A, Ordóñez JL, Otero AP, Blanca A, Sevillano V, Sanchez-Carbayo M, et al. Cyclin D3 gene amplification in bladder carcinoma in situ. *Virchows Arch.* 2010;457(5):555–61.
251. Gonzalez-campora R, Davalos-casanova G, Beato-moreno A, Garcia-escudero A, Jesus M, Megia P, et al. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma. 2007;250:292–9.
252. Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos M-A. The prevalence of bcl-2, p53, and ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol.* 1998 Feb;29(2):146–54.
253. Korkolopoulou P, Lazaris AC, Konstantinidou A-E, Kavantzas N, Patsouris E, Christodoulou P, et al. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol.* 2002;41(3):274–83.
254. Ajili F, Kaabi B, Darouiche A, Tounsi H, Kourda N, Chebil M, et al. Prognostic value of Bcl-2 and Bax tumor cell expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Ultrastruct Pathol.* 2012 Feb;36(1):31–9.
255. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):1–28.
256. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):55–62.
257. Janane A, Hajji F, Ismail TO, Elondo JC, Ghadouane M, Ameer A, et al. Evaluación de la sobreexpresión de proteína HER2 en cáncer vesical no músculo invasivo con énfasis en el grado tumoral y en la recurrencia. *Actas Urol Esp.* 2011;35(4):189–94.
258. Kumar S, Prajapati O, Vaiphei K, Parmar K, Sriharsha A, Singh S. Human epidermal growth factor receptor 2/neu overexpression in urothelial carcinoma of the bladder and its prognostic significance: Is it worth hype? *South Asian J Cancer.* 2015;4(3):115.
259. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *J Hematol Oncol. Journal of Hematology & Oncology;* 2018;11(1):1–23.
260. Wasfy RE, El-Guindy DM. CD133 and CD44 as cancer stem cell markers in bladder carcinoma. *Egypt J Pathol.* 2017;37(1):204–8.
261. Wu K, Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, et al. The role of {CD}44 in epithelial{–\$\mathsemicolon\$mesenchymal transition and cancer development. *Ott.* 2015;3783.
262. Wu C Te, Lin WY, Chang YH, Chen WC, Chen MF. Impact of CD44 expression on radiation response for bladder cancer. *J Cancer.* 2017;8(7):1137–44.
263. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(1):33–45.
264. Li L, Hao X, Qin J, Tang W, He F, Smith A, et al. Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice. *Gastroenterology.* Elsevier, Inc; 2014;146(4):1108–18.
265. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, et al. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2000;13(12):1315–23.
266. Gadalla HAH, Kamel NAH, Badary FAM, Elanany FG. Expression of CD44 protein in bilharzial and non-bilharzial bladder cancers. *BJU Int.* 2004;93(1):151–5.
267. Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol.* 1999;14(2):657–64.

268. Ramos D, Navarro S, Villamón R, Gil-Salom M, Llombart-Bosch A. Cytokeratin expression patterns in low-grade papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder. *Cancer*. 2003 Apr 15;97(8):1876–83.
269. Edgecombe A, Nguyen BN, Djordjevic B, Belanger EC, Mai KT. Utility of cytokeratin 5/6, cytokeratin 20, and p16 in the diagnosis of reactive urothelial atypia and noninvasive component of urothelial neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(3):264–71.
270. Harnden P, Allam A, Joyce AD, Patel A, Selby P, Southgate J. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology*. 1995;27(2):169–74.
271. Alsheikh A, Mohamedali Z, Jones E, Masterson J, Gilks CB. Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *Mod Pathol*. 2001;14(4):267–72.
272. Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3377–86.
273. Otto W, Denzinger S, Fritsche HM, Burger M, Rößler W, Bertz S, et al. Introduction and first clinical application of a simplified immunohistochemical validation system confirms prognostic impact of KI-67 and CK20 for stage T1 urothelial bladder carcinoma: Single-center analysis of eight biomarkers in a series of three hundr. *Clin Genitourin Cancer*. Elsevier Inc; 2013;11(4):537–44.
274. Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, et al. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer*. 2008 Feb 1;112(3):636–44.
275. Barros H. Epidemiologia clínica: história e fundamentos para a sua compreensão. *Rev Port Cir*. 2013;II série(24):51–6.
276. Evangelista R. Epidemiologia Clínica. O método epidemiológico na prática clínica e na investigação. [Internet]. news@FMUL. 2011 [cited 2018 Jul 30]. Available from: <http://news.fm.ul.pt/Content.aspx?tabid=73&mid=491&cid=1521>
277. Haynes, R.B. et al. Clinical epidemiology : how to do clinical practice research. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
278. Fletcher, R.; Fletcher S—. Clinical epidemiology : the essentials. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
279. Treweek S, Zwarenstein M. Making trials matter: Pragmatic and explanatory trials and the problem of applicability. *Trials*. 2009;10:1–9.
280. Oosterlinck, W; Lobel, B; Jakse, G; Sternberg C. Guidelines on Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2002;41.
281. Ferro AB. Imunohistoquímica; 2014.
282. Aguiar P. Factores de prognóstico do resultado do tratamento de doentes com Síndrome de Dependência do Álcool: estudo de coorte prospectivo de 6 meses. Universidade Nova de Lisboa; 2010.
283. Oddens JR, Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, Beek C Van De, Andel G Van, et al. The Effect of Age on the Efficacy of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin Relative to Maintenance Epirubicin in Patients with Stage Ta T1 Urothelial Bladder Cancer : Results from EORTC Genito-Urinary Group Study 30911. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2014;66(4):694–701.
284. Nishiyama N, Kitamura H, Hotta H, Takahashi A, Yanase M, Itoh N, et al. Construction of Predictive Models for Cancer-specific Survival of Patients with Non-muscle-invasive Bladder Cancer Treated with Intravesical Bacillus Calmette-Guérin : Results from a Multicenter with Bacillus Calmette-Guérin Retrospective Study. 2014;44(August):1101–8.

285. Liu X. Classification accuracy and cut point selection. *Stat Med*. 2012;31(23):2676–86.
286. Lee K, Jung ES, Choi YJ, Lee KY, Lee A. Expression of pRb, p53, p16 and cyclin D1 and their clinical implications in urothelial carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2010;25(10):1449–55.
287. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, De Aloysio G, Ferrari P, Ardito R, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: Its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer*. 2002;97(5):671–8.
288. Olsson H, Hultman P, Monsef N, Rosell J, Jahnson S. Immunohistochemical evaluation of cell cycle regulators: impact on predicting prognosis in stage t1 urinary bladder cancer. *ISRN Urol*. 2012;2012:379081.
289. Matsumoto H, Wada T, Fukunaga K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Naito K. Bax to Bcl-2 ratio and Ki-67 index are useful predictors of neoadjuvant chemoradiation therapy in bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2004;34(3):124–30.
290. Birkhahn M, Mitra AP, Cote RJ. Molecular markers for bladder cancer: The road to a multimarker approach. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007;7(12):1717–27.
291. Chu PG, Ph D, Weiss LM. Expression of Cytokeratin 5 / 6 in Epithelial Neoplasms : An Immunohistochemical Study of 509 Cases. 2002;15(1):6–10.
292. Eckstein M, Wirtz RM, Erben P, Kriegmair MC, Breyer J, Eidt S, et al. In stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), high KRT20 and low KRT5 mRNA expression identify the luminal subtype and predict recurrence and survival. *Virchows Arch*. *Virchows Archiv*; 2017;470(3):267–74.
293. Park J, Kim B, Lee J, Moon K, Jung M. Transcriptional Analysis of Immunohistochemically Defined Subgroups of Non-Muscle-Invasive Papillary High-Grade Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):570.
294. Aguiar P. Estatística em Investigação Epidemiológica SPSS - Guia Prático de Medicina. 2007. 236 p.
295. Campbell MJ, Swinscow TD. Statistics at Square One. Eleventh ed. Wiley-Blackwell; 2017.
296. Rothman K, Greenland S, Lash T. Modern Epidemiology. 3rd Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
297. Kleinbaum D, Klein M. Survival Analysis A Self-Learning Text. Second Edi. New York: Springer; 2005.
298. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Internet]. Globocan. 2012. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?
299. Sanguedolce F, Bufo P, Carrieri G, Cormio L. Predictive markers in bladder cancer: do we have molecular markers ready for clinical use? *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(5):291–304.
300. Malats N, Real FX. Epidemiology of Bladder Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;
301. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2006;3(6):327–40.
302. Horstmann M, Witthuhn R, Falk M, Stenzl A. Gender-Specific Differences in Bladder Cancer : A Retrospective Analysis. *Gend Med*. Excerpta Medica Inc. All rights reserved.; 2008;5(4):385–94.
303. Porta M, editor. A Dictionary of Epidemiology. 6 ed. Oxford University Press; 2014.
304. Rink M, Furberg H, Zabor EC, Xylinas E, Babjuk M, Pycha A, et al. Impact of Smoking and Smoking Cessation on Oncologic Outcomes in Primary Non – muscle-invasive Bladder Cancer. 2013;63:724–32.

305. Rink M, Xylinas E, Trinh Q, Lotan Y, Margulis V, Raman JD, et al. Gender-specific effect of smoking on upper tract urothelial carcinoma outcomes. 2013;623–37.
306. Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: A critical review of the literature. *BJU Int*. 2010;105(3):300–8.
307. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol*. European Association of Urology; 2016;69(2):300–10.
308. Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, et al. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol*. 2011;29(4):457–63.
309. Wolff I, Brookman-may S, May M. Sex difference in presentation and outcomes of bladder cancer: biological reality or statistical fluke? *Curr Opin Urol*. 2015;25(5):418–26.
310. Henning A, Wehrberger M, Madersbacher S, Pycha A, Martini T, Comploj E, et al. Do differences in clinical symptoms and referral patterns contribute to the gender gap in bladder cancer? *BJU Int*. 2013;112:68–73.
311. Taub DA, Hollenbeck BK, Cooper KL, Dunn RL, Miller DC, Taylor JMG, et al. Racial disparities in resource utilization for cystectomy. *Urology*. 2006;67(2):288–93.
312. Kulle Andreassen B, Grimsrud TK, Haug ES. Bladder cancer survival: Women better off in the long run. *Eur J Cancer*. 2018;95:52–8.
313. Fernandez-Gomez J, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, Hernandez R, et al. Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials. *Eur Urol*. 2008;53(5):992–1001.
314. Jancke G, Rosell J, Jahnson S. Impact of tumour size on recurrence and progression in Ta / T1 carcinoma of the urinary bladder. 2011;(May):388–92.
315. Ajili F, Manai M, Darouiche A, Chebil M. Tumor Multiplicity Is an Independent Prognostic Factor of Non-muscle-invasive Bladder Cancer Treated with Bacillus. 2012;36(March):320–4.
316. Nakai Y, Nonomura N, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A. Tumor Multiplicity is an Independent Prognostic Factor of Non-muscle-invasive High-grade (T1G3) Bladder Cancer. 2010;40(December 2009):252–7.
317. Denzinger S, Otto W, Fritsche H, Roessler W, Wieland WF, Hartmann A, et al. Original Article : Clinical Investigation Bladder sparing approach for initial T1G3 bladder cancer : Do multifocality , size of tumor or concomitant carcinoma in situ matter ? A long-term analysis of 132 patients. 2007;995–9.
318. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Tinolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol*. 2000;163(January):73–8.
319. Herr HW, Badalament RA, Amato DA, Laudone VP, Fair WR, Whitmore WF. Calmette-Guerin : a multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J Urol*. The American Urological Association Education and Research, Inc.; 1989;141(1):22–8.
320. Lopez-beltran A, Cheng L, Mazzucchelli R, Bianconi M, Blanca ANA, Scarpelli M, et al. Morphological and Molecular Profiles and Pathways in Bladder Neoplasms. 2008;2900:2893–900.
321. Miyamoto H, Miller JS, Fajardo DA, Lee TK, Netto GJ, Epstein JI. Non-invasive papillary urothelial neoplasms: The 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathol Int*. 2010;60(1):1–8.

322. Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in ta papillary urothelial tumors : relationship to grade , immunohistochemical expression of tumor markers , mitotic frequency and dna ploidy. 2001;165(April):1124–30.
323. Vollmer RT. A Review of Outcomes for Stage Ta Bladder Tumors. *Am Soc Clin P.* 2016;215–20.
324. Chen Z, Ding W, Xu K, Tan J, Sun C, Gou Y, et al. The 1973 WHO Classification Is More Suitable than the 2004 WHO Classification for Predicting Prognosis in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. 2012;7(10):1–7.
325. Pan CC, Chang YH, Chen KK, Yu HJ, Sun CH, Ho DMT. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: A clinicopathologic study of 1,515 cases. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(5):788–95.
326. Cao D, Vollmer RT, Luly J, Jain S, Roytman TM, Ferris CW, et al. Staging for Predicting Long-term Prognosis. URL. Elsevier Inc.; 2010;76(3):593–9.
327. Gontero P, Gillo A, Fiorito C, Oderda M, Pacchioni D, Casetta G, et al. Prognostic Factors of ‘High-Grade’ Ta Bladder Cancers according to the WHO 2004 Classification: Are These Equivalent to “High-Risk” Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer? *Urol Int.* 2014;(92):136–42.
328. Busato Júnior WFS, Almeida GL, Ribas CAPM, Ribas Filho JM, De Cobelli O. EORTC Risk Model to Predict Progression in Patients With Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Is It Safe to Use in Clinical Practice? *Clin Genitourin Cancer.* Elsevier Inc.; 2015;14(2):176–82.
329. Hernández V, de la Peña E, Martin MD, Blázquez C, Diaz FJ, Llorente C. External validation and applicability of the EORTC risk tables for non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2011;29(4):409–14.
330. Altieri VM, Castellucci R, Palumbo P, Verratti V, Sut M, Olivieri R, et al. Recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer using EORTC risk tables. *Urol Int.* 2012;89(1):61–6.
331. Alkhateeb SS, Neill M, Bar-Moshe S, Van Rhijn B, Kakiashvili DM, Fleshner N, et al. Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical Bacille Calmette-Guérin. *Urol Ann.* 2011;3(3):119–26.
332. Xylinas E, Kent M, Kluth L, Pycha A, Comploj E, Svatek RS, et al. Accuracy of the EORTC risk tables and of the CUETO scoring model to predict outcomes in non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2013;109(6):1460–6.
333. Seo KW, Kim BH, Park CH, Kim C II, Chang HS. The efficacy of the EORTC scoring system and risk tables for the prediction of recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer after intravesical bacillus calmette-guerin instillation. *Korean J Urol.* 2010;51(3):165–70.
334. van Rhijn BWG, Liu L, Vis AN, Bostrom PJ, Zuiverloon TCM, Fleshner NE, et al. Prognostic value of molecular markers, sub-stage and European Organisation for the Research and Treatment of Cancer risk scores in primary T1 bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110(8):1169–76.
335. Passoni N, Gayed B, Kapur P, Sagalowsky AI, Shariat SF, Lotan Y. Cell-cycle markers do not improve discrimination of EORTC and CUETO risk models in predicting recurrence and progression of non muscle-invasive high-grade bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* Elsevier; 2016;34(11):485.e7-485.e14.
336. Zhou H, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Huang WC, Mohammadi M, et al. Urothelial tumor initiation requires deregulation of multiple signaling pathways: Implications in target-based therapies. *Carcinogenesis.* 2012;33(4):770–80.

337. Long X, Zu X, Li Y, He W, Hu X, Tong S, et al. Epidermal Growth Factor Receptor and Ki-67 as Predictive Biomarkers Identify Patients Who Will Be More Sensitive to Intravesical Instillations for the Prevention of Bladder Cancer Recurrence after Radical Nephroureterectomy. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166884.
338. Tian Y, Ma Z, Chen Z, Li M, Wu Z, Hong M, et al. Clinicopathological and prognostic value of Ki-67 expression in bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(7):1–14.
339. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(2):114–9.
340. Luo Y, Zhang X, Mo M, Tan Z, Huang L, Zhou H, et al. High Ki-67 Immunohistochemical Reactivity Correlates With Poor Prognosis in Bladder Carcinoma: A Comprehensive Meta-Analysis with 13,053 Patients Involved. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(15):e3337.
341. Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); Combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014;32(1).
342. Ko K, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Significance of Ki-67 in non-muscle invasive bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(59):100614–30.
343. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzalez-Campora R, Requena MJ, Montironi R, et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol*. 2006;59(1):83–8.
344. Weight CJ, Murugan PJ, Chesla D, Tejpal R, Soubra A, Boshoven W, et al. Evaluating cell cycle progression score as a prognostic marker for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). *J Clin Oncol*. 2018;36(6_suppl):476.
345. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153–66.
346. Mitra AP, Hansel DE, Cote RJ. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Semin Oncol*. Elsevier Inc.; 2012;39(5):524–33.
347. Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol*. 2001;54(4):215–21.
348. Sánchez GA, Carrasco VJ, Blanca A, Campos HJP, Gómez GE, Valero RJ, et al. Protein expression of FGFR3, PI3K, AKT, p21Waf1/Cip1 and Cyclin D1 and D3 in patients with T1 bladder cancer: Clinical implications and prognostic significance. *Eur Urol Suppl*. Elsevier B.V.; 2016;15(13):e1691–3.
349. Matos L, Trufelli DC, Graciela M, et al. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomark Insights*. 2010;5:9–20.
350. Weyerer V, Schneckenpointner R, Filbeck T, Burger M, Hofstaedter F, Wild PJ, et al. Immunohistochemical and molecular characterizations in urothelial carcinoma of bladder in patients less than 45 years. *J Cancer*. 2017;8(3):323–31.
351. Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, et al. P53 Nuclear Protein Accumulation Correlates With Mutations in the P53 Gene, Tumor Grade, and Stage in Bladder Cancer. *Am J Pathol*. 1993;143(5):1389–97.
352. Ruas M, Peters G. The p16(INK4a)/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 1998;1378(2).
353. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol*. 2005;6(9):678–86.

354. Shariat SF, Weizer AZ, Green A, Laucirica R, Frolov A, Wheeler TM, et al. Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology*. 2000;56(5):735–40.
355. Goebell PJ, Groshen SG, Schmitz-Dräger BJ. P53 Immunohistochemistry in Bladder Cancer - a new approach to an old question. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. Elsevier Inc.; 2010;28(4):377–88.
356. Shariat SF, Lotan Y, Vickers A, Karakiewicz PI, Schmitz-Dräger BJ, Goebell PJ, et al. Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer. *Urol Oncol*. Elsevier Inc.; 2010;28(4):389–400.
357. Moonen PMJ, van Balken-Ory B, Kiemeny LALM, Schalken JA, Witjes JA. Prognostic Value of p53 for High Risk Superficial Bladder Cancer With Long-Term Followup. *J Urol*. 2007;177(1):80–3.
358. Esuvaranathan K, Chiong E, Thamboo TP, Chan YH, Kamaraj R, Mahendran R, et al. Predictive value of p53 and pRb expression in superficial bladder cancer patients treated with BCG and interferon-alpha. *Cancer*. 2007;109(6):1097–105.
359. López-Knowles E, Hernández S, Kogevinas M, Lloreta J, Amorós A, Tardón A, et al. The p53 pathway and outcome among patients with T1G3 bladder tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 PART 1):6029–36.
360. Shariat SF, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, et al. p53 Predictive Value for pT1-2 N0 Disease at Radical Cystectomy. *J Urol*. American Urological Association; 2009;182(3):907–13.
361. Schrier BP, Vriesema JLJ, Witjes JA, Kiemeny LALM, Schalken JA. The Predictive Value of p53, p27Kip1, and α -Catenin for Progression in Superficial Bladder Carcinoma. *Eur Urol*. 2006;50(1):76–82.
362. Ren B, Li W, Yang Y, Wu S. The impact of cyclin D1 overexpression on the prognosis of bladder cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2014;12:55.
363. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis. *Hum Pathol*. 2006;37(12):1568–76.
364. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Requena MJ, et al. Prognostic Factors in Survival of Patients With Stage Ta and T1 Bladder Urothelial Tumors. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(3):444–52.
365. Wagner U, Süess K, Luginbühl T, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, et al. Cyclin D1 overexpression lacks prognostic significance in superficial urinary bladder cancer. *J Pathol*. 1999;188(1):44–50.
366. Liu F-S, Jan Y-J, Lai C-R, Twu N-F, Lu C-H, Hung M-J, et al. Expression Analysis of Apoptosis-related Markers TP53, BCL-2, BAX and c-MYC in Female Genital Tract Sarcomas. *J Chinese Med Assoc*. Elsevier; 2008;71(12):628–34.
367. Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, Murray PG, El-Magrab MM, Young L, et al. Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*. 2003;88(4):586–92.
368. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*. 2008;455(7216):1076–81.
369. Gazzaniga P, Gradilone A, Vercillo R, Gandini O, Silvestri I, Napolitano M, et al. bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer*. 1996;69(2):100–4.
370. Giannopoulou I, Nakopoulou L, Zervas A, Lazaris AC, Stravodimos C, Giannopoulos A, et al. Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: Prognostic implications. *Urol Res*. 2002;30(5):342–5.
371. Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Roehrborn CG, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol*. 2007;8(2):128–36.


372. King ED, Matteson J, Jacobs SC, Kyprianou N. Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression. *J Urol.* 1996;155(1):316–20.
373. Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol.* 1994;173(4):333–9.
374. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609–19.
375. Arends MJ, WYLLIE AH. Apoptosis: Mechanisms and Roles in Pathology. *International Review of Experimental Pathology.* Elsevier BV; 1991. p. 223–54.
376. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4285–9.
377. Berger MS, Greenfield C, Gullick WJ, Haley J, Downward J, Neal DE, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br J Cancer.* 1987;56(5):533–7.
378. Têtu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernard P. Prevalence and clinical significance of HER-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol.* 1996;155(5):1784–8.
379. Chen CH, Tsai YS, Tzai TS. Significance of HER2 expression in patients with upper tract urothelial carcinoma: A meta-analysis. *Urol Sci. Elsevier Taiwan LLC;* 2016;27(4):238–43.
380. Chakravarti A, Winter K, Wu CL, Kaufman D, Hammond E, Parliament M, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemot. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62(2):309–17.
381. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol.* 1996 Jan;155(1):321–6.
382. Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, et al. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol.* 1991 Feb;145(2):423–7.
383. Garcia del Muro X, Torregrosa A, Muñoz J, Castellsagué X, Condom E, Vigués F, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer.* 2000;36(3):357–62.
384. Wang Z, Zhao K, Hackert T, Zöller M. CD44/CD44v6 a Reliable Companion in Cancer-Initiating Cell Maintenance and Tumor Progression. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6(August):1–28.
385. Hong RL, Pu YS, Hsieh TS, Chu JS, Lee WJ. Expressions of E-Cadherin and Exon V6-Containing Isoforms of CD44 and their Prognostic Values in Human Transitional Cell Carcinoma. *J Urol.* 1995;153(6):2025–8.
386. Yildirim A, Kösem M, Sayar I, Gelincik I, Yavuz A, Bozkurt A, et al. Relationship of PCNA, C-erbB2 and CD44S expression with tumor grade and stage in urothelial carcinomas of the bladder. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(6):1516–23.
387. Kobayashi K, Matsumoto H, Matsuyama H, Fujii N, Inoue R, Yamamoto Y, et al. Clinical significance of CD44 variant 9 expression as a prognostic indicator in bladder cancer. *Oncol Rep.* 2016;36(5):2852–60.
388. Sugino T, Gorham H, Yoshida K, Bolodeoku J, Nargund V, Cranston D, et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol.* 1996;149(3):873–82.
389. Erdoğan G, Küçükosmanoğlu I, Akkaya B. CD44 and MMP-2 expression in urothelial carcinoma. *Turkish J Pathol.* 2008;24(3):147–52.

390. Stavropoulos NE, Filliadis I, Ioachim E, Michael M, Mermiga E, Hastazeris K, et al. CD44 standard form expression as a predictor of progression in high risk superficial bladder tumors. *Int Urol Nephrol*. 2001;33(3):479–83.
391. Kuncová J, Urban M, Mandys V. Expression of CD44s and CD44v6 in transitional cell carcinomas of the urinary bladder : comparison with tumour grade , proliferative activity and p53 immunoreactivity of tumour cells. *APMIS*. 2007;1194–205.
392. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016;30(1):27–42.
393. Sjödaahl G, Lövgren K, Lauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, et al. Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2013;183(3):681–91.
394. McConkey DJ, Choi W, Shen Y, Lee IL, Porten S, Matin SF, et al. A Prognostic Gene Expression Signature in the Molecular Classification of Chemotherapy-naïve Urothelial Cancer is Predictive of Clinical Outcomes from Neoadjuvant Chemotherapy: A Phase 2 Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisp. *Eur Urol. European Association of Urology*; 2016;69(5):855–62.
395. Czerniak B, Dinney C, McConkey D. Origins of Bladder Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11(1):149–74.
396. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet*. 2016;388(10061):2796–810.
397. McConkey DJ, Choi W, Ochoa A, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CPN. Therapeutic Opportunities in the Intrinsic Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;29(2):377–94.
398. Dyrskjot L, Zieger K, Real FX, Malats N, Carrato A, Hurst C, et al. Gene Expression Signatures Predict Outcome in Non-Muscle-Invasive Bladder Carcinoma: A Multicenter Validation Study. *Clin Cancer Res*. 2007;13(12):3545–51.
399. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, et al. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes*. ???; 2012;5(1):1.
400. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.

9. Anexos



Predicting outcomes in non-muscle invasive (Ta/T1) bladder cancer: the role of molecular grade based on luminal/basal phenotype

Jorge Rebola^{1,2} · Pedro Aguiar³ · Ana Blanca⁴ · Rodolfo Montironi⁵ · Alessia Cimadamore⁵ · Liang Cheng⁶ · Vanessa Henriques⁷ · Paula Lobato-Faria³ · Antonio Lopez-Beltran^{8,9} 

Received: 6 February 2019 / Revised: 14 May 2019 / Accepted: 3 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Bladder cancer tumors can be divided into two molecular subtypes referred to as luminal or basal. Each subtype may react differently to current chemotherapy or immunotherapy. Likewise, the technology required for comprehensive molecular analysis is expensive and not yet applicable for routine clinical diagnostics. Therefore, it has been suggested that the immunohistochemical expressions of only two markers, luminal (CK20+, CK5/6–) and basal (CK5/6+, CK20–), is sufficient to identify the molecular subtypes of bladder cancer. This would represent a molecular grade that could be used in daily practice. Molecular classification is done using immunohistochemistry to assess luminal-basal phenotype based on tissular expression of CK20 and CK5/6 as surrogate for luminal or basal subtypes, respectively. A series of 147 non-muscle-invasive bladder carcinoma cases was selected, and the tumors were divided into four subgroups based on the presence of CK20 and/or CK5/6, that is, null (CK20–, CK5/6–), mixed (CK20+, CK5/6+), basal (CK20–, CK5/6+), and luminal (CK20+, CK5/6–) categories. Survival analysis was estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Hazard ratios were calculated by Cox multivariate analysis. The molecular grade included cases with null ($n = 89$), mixed ($n = 6$), basal ($n = 20$), and luminal ($n = 32$) phenotypes with differences in recurrence-free, progression-free and cancer-specific survival associated with molecular-grade categories in patients with low- or high-grade Ta, or high-grade T1 tumors. The multivariate analysis identified the luminal phenotype as a predictor of more aggressive neoplasms. Our findings provide a rationale to investigate luminal and basal subtypes of bladder cancer using two gene expression signatures as surrogate markers and show that non-muscle-invasive bladder carcinoma can be stratified into biologically and clinically different subgroups by using an immunohistochemical classifier.

Keywords Bladder cancer · Survival · Prognosis · Luminal · Basal · Molecular grade

Introduction

Bladder cancer is traditionally divided into non-muscle or muscle invasive subtypes [1–10]. While the non-muscle-invasive bladder carcinoma and muscle-invasive bladder carcinoma tumors are distinguishable from each other, at the

molecular level, there are two major molecular subtypes referred to as luminal and basal, which show distinct clinical behavior and sensitivity to current chemotherapy and immunotherapy [11–32].

Initial studies based on whole-genome transcriptional analysis identified 5 categories of tumors that demonstrated

✉ Antonio Lopez-Beltran
emllobea@uco.es

¹ Urology Unit, Champalimaud Clinical Center, Lisbon, Portugal

² National School of Public Health, Universidade NOVA de Lisboa, Lisbon, Portugal

³ Public Health Research Center, National School of Public Health, Universidade NOVA de Lisboa, Lisbon, Portugal

⁴ Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba, Cordoba, Spain

⁵ Institute of Pathological Anatomy and Histopathology, School of Medicine, Polytechnic University of the Marche Region (Ancona), United Hospitals, Ancona, Italy

⁶ Departments of Pathology and Laboratory Medicine and Urology, Indiana University, School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

⁷ Anatomic Pathology Service, Champalimaud Clinical Center, Lisbon, Portugal

⁸ Department of Surgery and Pathology, Faculty of Medicine, Avda. Menendez Pidal S/N, 14004 Cordoba, Spain

⁹ Champalimaud Clinical Center, Lisbon, Portugal

differential expression of cytokeratin (CK), fibroblast growth factor receptor-3 mutational status, cell adhesion gene profiles, and cell cycle regulatory gene profiles [11–32]. The 3 major subtypes, urobasal, genomically unstable, and squamous cell carcinoma-like, can be distinguished by pathologic and immunohistochemical features [11–32]. Patschan et al. [22] showed significant differences in the outcome of T1 patients stratified for molecular subtype. The study identified 3 molecular subtypes (classes 1–3) with high-risk tumors (class 2) harboring frequent TP53 and ERBB2 alterations and APOBEC mutations, low-risk tumors (class 1) enriched for fibroblast growth factor receptor-3 mutations, and class 3 tumors showing basal-like characteristics. [22] Reportedly, molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder carcinoma could help to better categorize the prognosis and response to current therapies [11–32]; however, robust predictive data is currently lacking [18–21, 24, 25, 30, 33–39]. Recently, Choi et al. [34] suggested the potential utility of immunohistochemical markers as a surrogate of molecular subtypes. A number of these markers have been identified to support luminal (CK20, GATA3, FOXA1) or basal (CK5/6, p63, CK14) classifications. Interestingly, a two-cytokeratin panel (CK20, CK5/6) was identified with the potential to detect luminal/basal phenotypes in urothelial carcinoma [25, 34].

In this current study, we assessed the expression status and prognostic significance of a two-marker immunohistochemical

classifier using CK20 and CK5/6 as surrogate for luminal/basal phenotype in conventional non-muscle-invasive bladder carcinoma patients.

Material and methods

Patients and clinical data

Approval from an institutional review board was obtained. The study cohort was a retrospective series of 147 patients with primary bladder tumors treated with a complete transurethral resection of the bladder between 2003 and 2015. T1 carcinoma patients received an additional transurethral bladder resection to exclude pT2 disease. Patients with high-grade carcinoma received adjuvant treatment with intravesical BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*). Patient's follow-up (number of months from the diagnostic procedure to the date of the most recent cystoscopy, last visit or death) was 76 (median), with a range of 6 to 120 months. Disease recurrence was defined as first tumor relapse in the bladder regardless of tumor stage. Tumor stage progression was defined as a shift to any higher stage (T1–T2–T4) in Ta tumors; stage T2–T4 in T1 tumors, or the appearance of metastasis. Survival time was the period between diagnosis and death. Cancer-related death that was caused by bladder carcinoma.

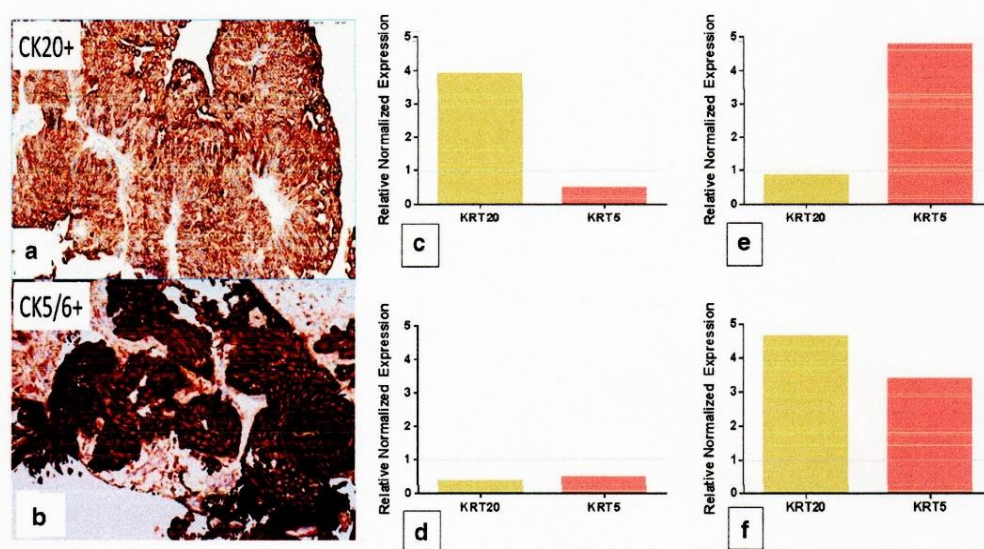


Fig. 1 Molecular-phenotype grade of NMIBC based on the phenotypic expression of CK20 as surrogate of luminal molecular subtype (a) or CK5/6 as surrogate of the basal molecular subtype (b) (anti-CK20, 100X; anti-CK5/6, 100X). qRT-PCR analysis of KRT20 and KRT5 expression in selected cases showing KRT20 upregulation and KRT5

downregulation (case 6) supporting luminal subtype (c), KRT20 and KRT5 downregulation (case 89) supporting null subtype (d), KRT20 downregulation and KRT5 upregulation (case 11) supporting basal subtype (e), and KRT20 up-regulation and KRT5 up-regulation (case 45) supporting mixed subtype (f)

Table 1 Normalized expression KRT 20 and KRT 5 by qRT-PCR in 10 selected cases representative of different molecular-phenotype grade categories also investigated by immunohistochemistry showing similar results with both methods. Level of expression above 1 represent upregulation of the marker and level of expression below 1 represents downregulation of the marker (see also “Material and methods” section and Fig. 1)

Case #	KRT 20*	KRT 5*	Grade/stage	Suggested molecular subtype
1	0.01730	0.65474	LGTa	Null
6	3.90218	0.49040	LGTa	Luminal
9	0.16999	12.38655	LGTa	Basal
11	0.84945	4.78284	HGT1	Basal
17	8.33793	0.06792	HGT1	Luminal
34	2.36639	0.43249	HGT1	Luminal
45	4.65062	3.38195	HGT1	Mixed
60	0.00272	10.01338	LGTa	Basal
83	1.76103	0.37990	HGTa	Luminal
89	0.36501	0.48424	LGTa	Null

*Normalized expression $\Delta\Delta C_q$ for KRT 20 and KRT 5

KRT 20, keratin 20; KRT 5, keratin 5; grade/stage, pathologic grade and stage following the WHO 2016 classification and the AJCC 8th edition

Pathologic evaluation

Pathologic re-assessment of all primary tumors and their recurrences was done by three pathologists blinded to the clinical status. Forty randomly selected bladder carcinoma cases

served as a preliminary sample set to facilitate agreement on grading and staging. Sections were graded in the worst differentiated area. If a discrepancy occurred, a review round was organized to obtain consensus on a diagnosis. Pathologic

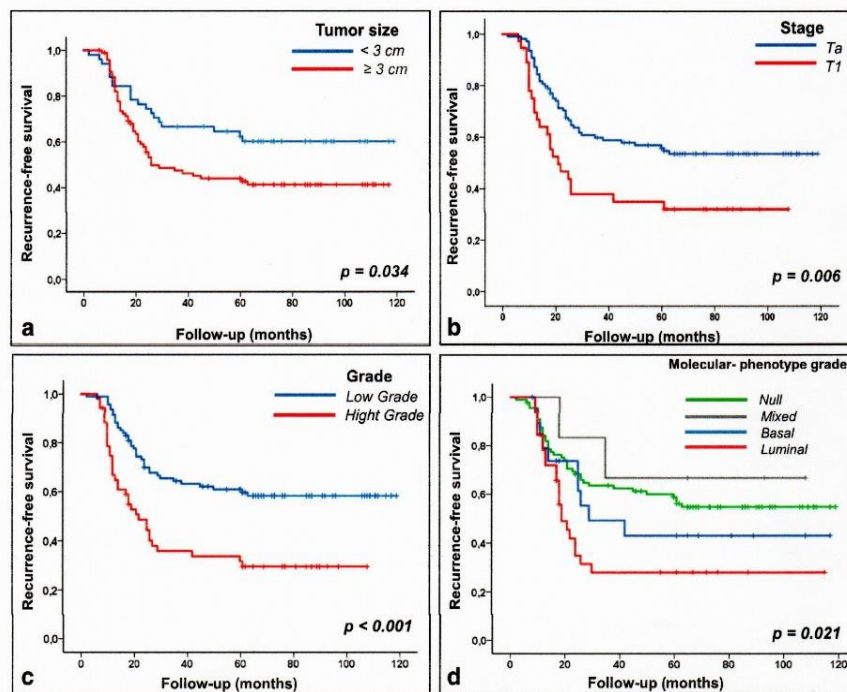


Fig. 2 Parameters related to recurrence-free survival in NMIBC patients. Similar to other classic predictors in the study (a, b, and c), luminal molecular-phenotype grade predicted most aggressive tumors (d); meanwhile, mixed molecular phenotype resulted in less aggressive tumors (d)

grade and stage were determined according to the WHO/AJCC/TNM 2016 revision. [9]

Qualitative and quantitative assessment of molecular-phenotype grade

A representative 4- μ thick paraffin block was cut from each tumor, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol, and then washed with PBS. For antigen retrieval, the sections were boiled in 10 mM citrate buffer (pH 6.0). Sections were incubated with primary mouse monoclonal antibodies (CK20 [Ks20.8, prediluted; DAKO, Carpinteria, CA] and CK5/6 [D5/16B4, 1:50; Cell Marque, Rocklin, CA]) incorporating positive and negative controls. Immunohistochemical stains were performed using the EnVision system (DakoCytomation, Denmark) with 30 min at room temperature with diaminobenzidine chromogen substrate solution (0.6 mg/ml in tris buffer saline, pH 7.6 with 12 ml 30% hydrogen peroxide). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Three pathologists

evaluated the immunohistochemical slides independently using a Zeiss Scope A1 optical microscope (Jena, Germany). The same area on each slide was examined using random fields delineated by a 1-cm² graded ocular grid attached to the eyepiece of the microscope. A negative immunohistochemical pattern was assigned to cases showing negative-to-rare (<1%) single randomly distributed cells (in both CK20 and CK5/6 cases) or rare (<1%) single cells at the basal portion of the papillae (CK5/6) (Fig. 1). The typical positive case was characterized as presenting several positive cells seen at deeper levels of the papillae exhibiting high intensity. Four patterns of expression were identified (null (CK20-, CK5/6-), mixed (CK20+, CK5/6+), basal (CK20-, CK5/6+), luminal (CK20+, CK5/6-)).

RNA extractions, cDNA synthesis, and qRT-PCR assays

To increase the specificity of the immunohistochemical analysis, KRT20 and KRT5 were also investigated in 10 selected cases using qRT-PCR. [40]

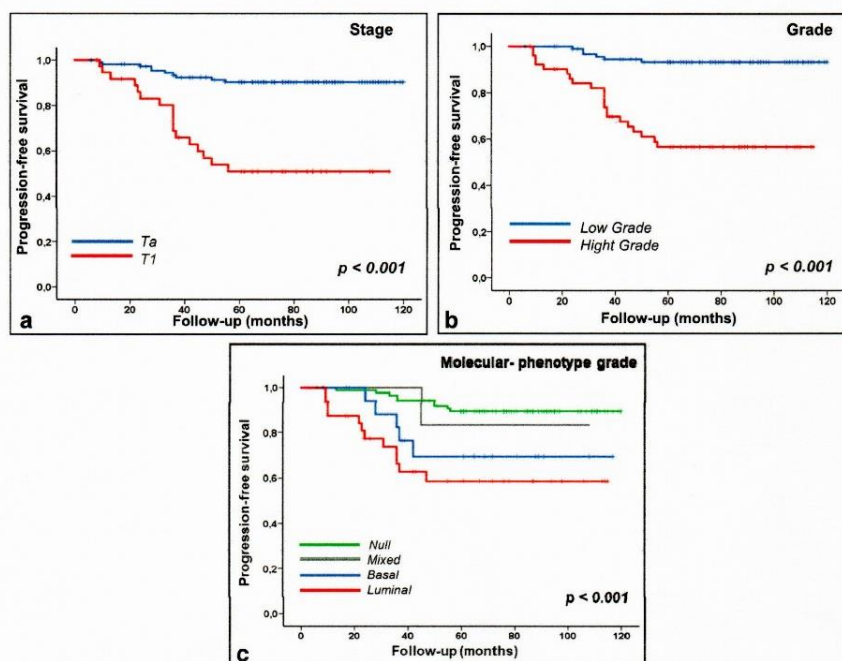


Fig. 3 Parameters related to progression-free survival in NMIBC patients. Similar to the other classic predictors in the study (a, b), luminal molecular-phenotype grade was predictive of more aggressive tumors; meanwhile, null molecular phenotype resulted in less aggressive neoplasms (c)

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen, CA). The RNA concentration and purity were tested using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed with 500 ng total RNA using a SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline). Primers were KRT20F: GGACGACACCCAGCGTTTAT and KRT20R: CGCTCCCATAGTTCACCGTG; KRT5F: CCAAGGTTTGATGCACTGATG and KRT5R: TGTCAGAGACATGCGTCTGC.

Each PCR was performed with a 20 μ L final volume containing 4 μ L cDNA, 0.8 μ L (each) primers, 4.4 μ L diH₂O, and 10 μ L 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (iTaQ Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Relative gene expression was performed by RT-PCR using CFX Connect™ detection system and Ct (threshold cycle) values were quantified and converted to raw data with CFX Manager software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). [40].

The thermal cycling conditions included a denaturation program (95 °C for 5 min), and an amplification program repeated 40 times (95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s). Fold change was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct$ was the normalized cycle threshold value relative to endogenous controls: GAPDH: TGTCCCACTGCCAACGTGTCA and GAPDH: AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT [40]. Gene expression was calculated using control samples (healthy adjacent urothelial tissue). A relative quantification above 1 represents upregulation and below 1 represents downregulation (Fig. 1, Table 1).

Statistical analysis

The aim of the study was to search for differences between the four molecular grades (null, mixed, basal, and luminal) regarding disease-free, progression-free, and overall cancer-specific survival in non-muscle-invasive bladder carcinoma.

Survival analysis was conducted using the Kaplan-Meier method and differences among groups were tested for significance using the log-rank test. Hazard ratios were calculated with 95% confidence intervals using the Cox regression, and in all calculations, a *p* value of less than or equal to 0.05 was considered indicative of a statistically significant difference.

All statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (IBM® SPSS® Statistics, Armonk, NY, USA) version 24.0 for Windows® Software.

Results

Mean patient age at diagnosis of the 147 (17 were female) cases was 66.88 years (range 29–93 years). Ninety-five (64.6%) patients had low-grade non-invasive (Ta) carcinoma; 15 patients (10.2%) had high-grade non-invasive (T_a) carcinoma; and 37 (25.2%) patients had T₁ high-grade invasive carcinoma. Fifty-one patients had < 3 cm tumors. Tumor size ranged from 1 to 8 cm (mean 3.27 cm). The molecular grade

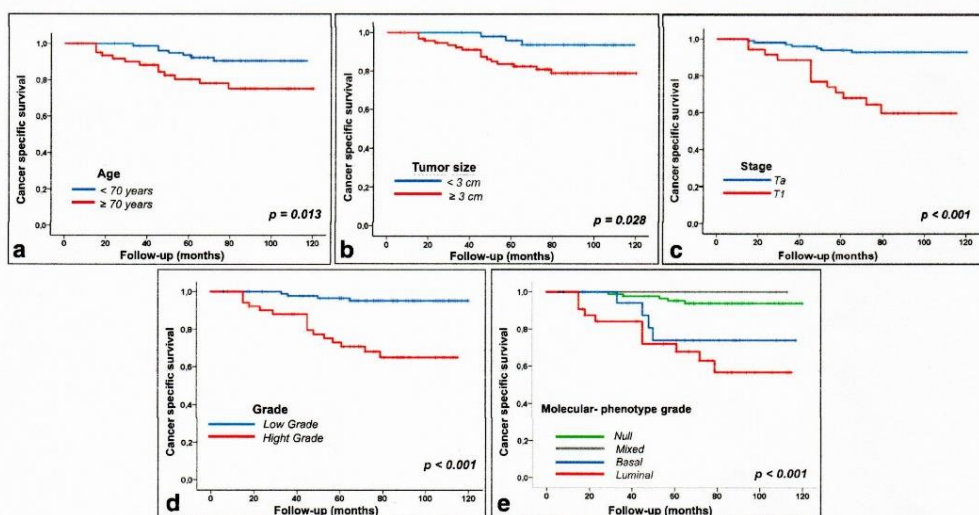


Fig. 4 Parameters related to cancer-specific survival in NMIBC patients. Similar to the other classic predictors in the study (a, b, c, and d), luminal molecular-phenotype grade was predictive of more aggressive tumors (e);

meanwhile, mixed molecular phenotype resulted in less aggressive neoplasms (e)

Table 2 Characteristics of 147 patients and survival analysis of clinicopathologic variables in study including molecular-phenotype grading

Variable ^{&}	Overall N = 147 (%)	Recurrence-free survival N = 74 (%)		Progression-free survival N = 120 (%)		Cancer-specific survival N = 127 (%)	
		<i>p</i> value*		<i>p</i> value*		<i>p</i> value*	
Age (years) [#]			0.691		0.150		0.013
< 70	83 (56.5)	39 (47.0)		70 (84.3)		76 (91.6)	
≥ 70	64 (43.5)	35 (54.7)		50 (78.8)		51 (79.7)	
Gender			0.424		0.062		0.112
Female	17 (11.6)	8 (47.1)		17 (100)		17 (100)	
Male	130 (88.4)	66 (50.8)		103 (79.2)		110 (84.6)	
Tumor size (cm) [§]			0.034		0.162		0.028
< 3	51 (34.7)	31 (60.8)		44 (86.3)		48 (94.1)	
≥ 3	96 (65.3)	43 (44.8)		76 (79.2)		79 (82.3)	
Stage			0.006		< 0.001		< 0.001
Ta	110 (74.8)	61 (55.5)		100 (90.9)		103 (93.6)	
T1	37 (25.2)	13 (35.1)		20 (54.1)		24 (64.9)	
Grade			< 0.001		< 0.001		< 0.001
LG	95 (86.4)	57 (60.0)		89 (93.7)		91 (95.8)	
HG	52 (13.6)	17 (32.7)		31 (59.6)		36 (69.3)	
Molecular grade			0.021		< 0.001		< 0.001
Null	89 (60.5)	50 (56.4)		80 (89.9)		84 (94.4)	
Mixed	6 (4.1)	4 (66.7)		5 (83.3)		6 (100)	
Basal	20 (13.6)	10 (50.0)		15 (75.0)		16 (80.0)	
Luminal	32 (21.8)	10 (31.3)		20 (62.5)		21 (65.6)	

*Log-rank test; #mean age (range) 66.88 ± 10.8 (29–93); §mean tumor size (cm) (range) 3.27 ± 1.56 (1–8); &Follow-up (months) median (range) 76 (6–120)

SD standard deviation

included patients with null (*n* = 89), mixed (*n* = 6), basal (*n* = 20), and luminal (*n* = 32) phenotypes, with differences in recurrence-free, progression-free, and cancer-specific survival associated with molecular-grade categories (Figs. 2, 3, and 4) (Table 2).

T status and grade were also associated with recurrence-free, progression-free, and cancer-specific survival (Table 2). Tumor size was associated with recurrence-free and cancer-specific survival but not to progression-

free survival, and patient age was associated with cancer-specific survival only (Table 2; Figs. 2, 3, and 4). Phenotype grade was also associated with recurrence-free, progression-free, and cancer-specific survival in patients with low-grade Ta (Table 3; Fig. 5) or high-grade Ta non-invasive (Table 4; Fig. 6) tumors, or T1 high-grade invasive (Table 5; Fig. 7) tumors.

Using the Cox multivariate analysis, pathologic and molecular grades were identified as independent

Table 3 Survival analysis of patients with TaLG bladder carcinoma according to molecular-phenotype grade

Molecular grade	Overall TaLG N = 95 (%)	RFS N = 57 (%)	<i>p</i> value*	PFS N = 89 (%)	<i>p</i> value*	CSS N = 91 (%)	<i>p</i> value*
Null	66 (69.5)	43 (65.2)	0.183	63 (95.5)	0.005	64 (97.0)	< 0.001
Mixed	3 (3.2)	2 (66.7)		3 (100)		3 (100)	
Basal	5 (5.3)	2 (40.0)		3 (60.0)		3 (60.0)	
Luminal	21 (22.1)	10 (47.6)		20 (95.2)		21 (100)	

*Log-rank test

RFS, recurrence-free survival; PFS, progression-free survival; CSS, cancer-specific survival

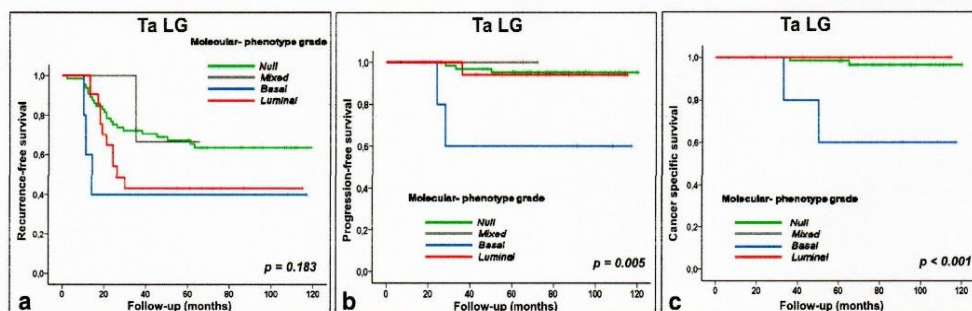


Fig. 5 Molecular-phenotype grade was a predictor of RFS, PFS, and CSS in patients with non-invasive (Ta) low-grade urothelial carcinoma, with basal phenotype resulting in more aggressive neoplasms (RFS, PFS, CSS) and mixed phenotype resulting in the less aggressive phenotype (RFS, PFS, CSS)

predictors of recurrence-free, progression-free, and cancer-specific survival, with the high pathologic grade and the luminal molecular grade associated with more aggressive neoplasms. Age was also identified as an independent predictor of cancer-specific survival in our cohort series (Table 6).

Discussion

Recent studies suggest that bladder cancers can be divided into two candidates intrinsic molecular subtypes referred to as luminal and basal [11–32, 35]. Luminal tumors have an expression signature similar to intermediate/superficial layers of the urothelium. Basal tumors show an expression signature similar to the basal layer of the urothelium. [13] The immunohistochemical expressions of two markers, luminal (GATA3) and basal (CK5/6), were sufficient to identify the molecular subtypes of bladder cancer with 90% accuracy in one study [13]. Immunohistochemistry of CK5 (basal) and CK20 (luminal) expression can identify upper tract urothelial carcinomas with worse cancer-specific survival [25].

Recently, Patschan et al. [22] identified outcome differences in T1 patients stratified as 3 molecular subtypes (classes 1–3). High-risk tumors (class 2) harbored

frequent *TP53* and *ERBB2* alterations and APOBEC-related mutations, whereas low-risk tumors (class 1) were enriched for fibroblast growth factor receptor-3 mutations. Class 3 tumors showed basal-like characteristics.

Our paper aimed to corroborate the proposal by Choi et al. [34] on the use of CK20 and CK5 as surrogate for luminal-basal by immunohistochemistry and therefore to establish its potential use in routine histopathology. We also attempted to corroborate the findings by Breyer et al. [40] using the same RT-PCR technology to molecularly validate the correspondence between immunohistochemistry and RT-PCR data in selected cases with the purpose of adding robustness to our study. Differences among these publications include the inclusion of muscle-invasive bladder carcinoma by Choi et al. [34] and the restriction to pT1 carcinomas by Breyer et al. [40] Interestingly, our results show an association between luminal-basal subtypes and aggressiveness in non-muscle-invasive bladder carcinoma confirms that the use of the immunohistochemical expression of CK20/CK5–6 can be used to classify the molecular subtypes, [25, 34] thus supporting the potential prognostic use of molecular grading in non-muscle-invasive bladder carcinoma.

Few studies have addressed the role of immunohistochemistry in the treatment of non-muscle-invasive

Table 4 Survival analysis of patients with TaHG bladder carcinoma according to molecular-phenotype grade

Molecular grade	Overall TaHG N = 15 (%)	RFS N = 4 (%)	p value*	PFS N = 13 (%)	p value*	CSS N = 12 (%)	p value*
			0.004		< 0.001		< 0.001
Null	6 (40)	0 (0.0)		5 (83.3)		6 (100)	
Mixed	1 (6.7)	1 (100)		1 (100)		1 (100)	
Basal	6 (40)	3 (50.0)		5 (83.3)		5 (83.3)	
Luminal	2 (13.3)	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)	

*Log-rank test

RFS, recurrence-free survival; PFS, progression-free survival; CSS, cancer-specific survival

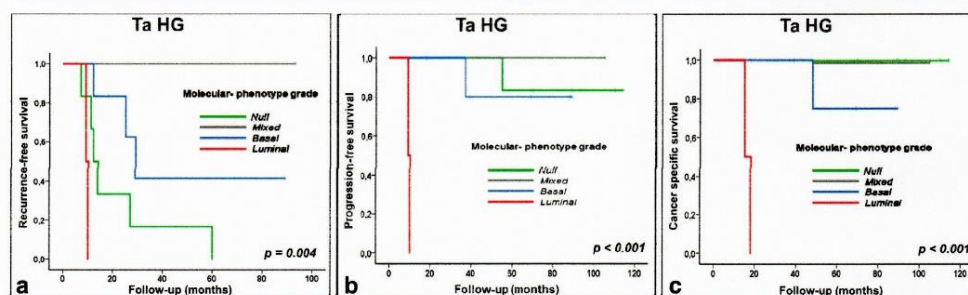


Fig. 6 Molecular phenotype-grade was a predictor of RFS, PFS, and CSS in patients with non-invasive (Ta) high-grade urothelial carcinoma with luminal phenotype resulting in more aggressive neoplasms (RFS, PFS,

CSS) and mixed phenotype resulting in the less aggressive disease (RFS, PFS, CSS)

bladder carcinoma following the introduction of molecular taxonomy [13, 25, 34]. A classification system that divides urothelial carcinoma into luminal and basal categories was recently published [34, 36, 37]. Whereas luminal carcinomas expressed genes associated with superficial umbrella cells and appeared similar to superficial papillary tumors, basal carcinomas expressed genes more characteristic of urothelial basal cells, which have a worse prognosis but may be more responsive to neoadjuvant chemotherapy or checkpoint immunotherapy [11–32].

Our study followed a similar rationale in the treatment of non-muscle-invasive bladder carcinoma and showed a characteristic molecular-grade signature with most cases (60.5%) presenting null phenotypes, luminal phenotypes (22%), basal phenotypes (14%), or a mixed category accounting for 4% of the cases. Interestingly, our multivariate analysis revealed that the luminal molecular grade was an independent predictor of most aggressive tumors in non-muscle-invasive bladder carcinoma as seen by its association with recurrence-free, progression-free, and cancer-specific survival, with hazard ratios of 2.3, 8.1, or 9.0, respectively. This is similar to the data reported

by Breyer et al. [40] for pT1 bladder carcinomas. Additionally, we have observed a statistical power similar to the molecular grade as compared with other classic pathologic parameters including tumor size and pathologic grade or stage. Null or mixed molecular grades resulted in less aggressive tumors in our series. Molecular grade also had a power similar to the classic clinical parameters such as patient's age and gender, thus supporting molecular grade as potentially relevant in practice. Furthermore, if validated, molecular grade could be implemented as a predictor of response to therapeutic strategies in non-muscle-invasive bladder carcinoma patients. Also, our study showed molecular grade as a predictor of recurrence-free, progression-free, and cancer-specific survival in patients with Ta/T1 high-grade urothelial carcinoma with a luminal phenotype resulting in more aggressive neoplasms, and mixed phenotype resulting in less aggressive neoplasms. Therefore, if validated in non-muscle-invasive bladder carcinoma, the molecular grading could assist in the stratification of patients in categories relevant with prognosis. Furthermore, our study did not specifically address the issue of response to therapy based on luminal/basal phenotype due to the fact that all high-

Table 5 Survival analysis of patients with T1HG bladder carcinoma according to molecular-phenotype grade

Molecular grade	Overall T1HG N = 37 (%)	RFS N = 13 (%)	p value*	PFS N = 20 (%)	p value*	CSS N = 24 (%)	p value*
Null	17 (45.9)	7 (41.2)	0.015	12 (70.6)	< 0.001	14 (82.4)	< 0.001
Mixed	2 (5.4)	1 (50.0)		1 (50.0)		2 (100)	
Basal	9 (24.3)	5 (55.6)		7 (77.8)		8 (88.9)	
Luminal	9 (24.3)	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)	

*Log-rank test

RFS, recurrence-free survival; PFS, progression-free survival; CSS, cancer-specific survival

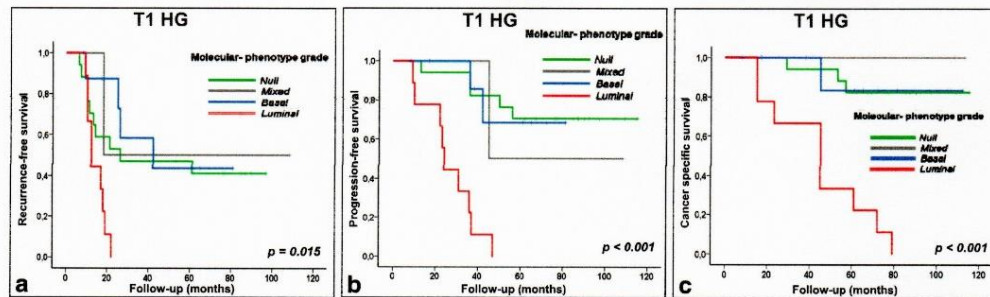


Fig. 7 Molecular phenotype grade was a predictor of RFS, PFS, and CSS in patients with invasive (T1) high-grade urothelial carcinoma with luminal phenotype resulting in more aggressive neoplasms (RFS, PFS, CSS) and mixed phenotype resulting in the less aggressive disease (RFS, PFS, CSS)

grade Ta/T1 cases had been treated by intravesical bacillus Calmette-Guerin (as per guidelines); however, our finding that the luminal (chemo-resistant) phenotype was independently associated with more aggressive behavior than basal (chemo-sensitive) phenotype might suggest that basal tumors would be more responsive to current intravesical bacillus Calmette-Guerin protocols; a finding that needs to be substantiated in larger prospective series. This is actually not surprising since the cancer genome atlas derived data on muscle-invasive bladder carcinoma suggest that luminal cases have limited response to systemic immunotherapy with checkpoint inhibitors. [35] An additional topic of interest is the fact that our study presents data related to conventional urothelial carcinoma of

the non-muscle invasive subtype, and therefore, it does not include the analysis of luminal-basal phenotype in the so-called bladder carcinoma with variant histology; a fact that could be considered a limitation. However, the potential interest of variant histology in modern urinary bladder pathology suggests that an entirely separate study would be necessary to properly address this topic, and this is out of the scope of our study. [41, 42]

In conclusion, our study shows that molecular-phenotype grade is feasible and dividing non-muscle-invasive bladder carcinoma patients in prognostically and potentially predictive categories add additional information regarding pathologic grade and stage. Finally, it is relevant to say that more studies are needed to fully develop the potential of this classification

Table 6 Multivariate survival analysis of patients with non-muscle invasive (Ta/T1) bladder cancer

Variable	Recurrence-free survival N = 74		Progression-free survival N = 120		Cancer-specific survival N = 127	
	p value**	Hazard ratio (CI 95%)	p value**	Hazard ratio (CI 95%)	p value**	Hazard ratio (CI 95%)
Age (years)	—	—	—	—	—	—
< 70*					0.010	Reference
≥ 70						3.428 (1.345–8.741)
Tumor size (cm)	0.099		—	—	0.493	
< 3*		Reference				Reference
≥ 3		1.578 (0.918–2.713)				1.570 (0.432–5.702)
Stage	0.143		0.676		0.985	
Ta*		Reference		Reference		Reference
T1		0.563 (0.261–1.215)		1.278 (0.404–4.043)		1.013 (0.263–3.906)
Grade	<0.001		<0.001			
LG*		Reference		Reference	<0.001	Reference
HG		3.005 (1.820–4.962)		11.575 (4.411–30.379)		9.604 (3.130–29.471)
Molecular grade	0.004		<0.001		0.001	Reference
Null*	0.286	0.459 (0.110–1.917)	0.990	Reference	0.983	—
Mixed	0.402	0.730 (0.349–1.526)	0.555	0.987 (0.125–7.818)	0.186	2.474 (0.647–9.462)
Basal	0.002	2.307 (1.350–3.943)	<0.001	1.396 (0.461–4.223)	<0.001	9.036 (3.090–26.420)
Luminal				8.142 (3.259–20.340)		

*Reference category/denominator of the comparison in the Cox regression analysis; **p value, obtained the Wald test of the Cox regression analysis; IC (95%) confidence interval 95% for HR

in practice, and for that, the pathologist is to play a very important role in the near future.

Author contribution ALB conceived and designed the study and wrote, edited, and reviewed the manuscript. ALB, JR, PA, and PLF designed the study and reviewed the manuscript. JR, PA, and PLF performed the statistical analysis and reviewed the manuscript. JF, AC, VH, and AB collected and analyzed data and reviewed the manuscript. AB performed and evaluated RT-PCR methods. RM and LC critically read and edited the final manuscript. All authors gave final approval for publication.

Funding Supported in part by the Grant PI17/01981 (FIS (Ministry of Health), Madrid, Spain).

Compliance with ethical standards

Approval from an institutional review board was obtained.

Competing interests The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent Written informed consent was obtained from all the patients included in the study.

References

- Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Holmberg E, Busch C, Johansson SL (1999) Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol* 162:702–707
- D'Andrea D, Abufaraj M, Susani M et al (2018) Accurate prediction of progression to muscle-invasive disease in patients with pT1G3 bladder cancer: a clinical decision-making tool. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 36:239.e1–239.e7. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.01.018>
- Gontero P, Sylvester R, Pisano F, Joniau S, Vander Eeck K, Serretta V, Larré S, di Stasi S, van Rhijn B, Witjes AJ, Grotenhuis AJ, Kiemeny LA, Colombo R, Briganti A, Babjuk M, Malmström PU, Oderda M, Irani J, Malats N, Baniel J, Mano R, Cai T, Cha EK, Ardeli P, Varkarakis J, Bartoletti R, Spahn M, Johansson R, Freja B, Soukup V, Xylinas E, Dalbagni G, Karnes RJ, Shariat SF, Palou J (2015) Prognostic factors and risk groups in T1G3 non-muscle-invasive bladder cancer patients initially treated with bacillus calmette-guérin: results of a retrospective multicenter study of 2451 patients. *Eur Urol* 67:74–82
- Mulder AH, Van Hootegem JCSP, Sylvester R et al (1992) Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle related nuclear antigen (Ki67). *J Pathol* 166:37–43
- Yan Y, Andriole GL, Humphrey PA, Kibel AS (2002) Patterns of multiple recurrences of superficial (Ta/T1) transitional cell carcinoma of bladder and effects of clinicopathologic and biochemical factors. *Cancer* 95:1239–1246
- Lopez-Beltran A, Montironi R (2004) Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 46:170–176
- Lopez-Beltran A (2008) Bladder cancer: clinical and pathological profile. *Scand J Urol Nephrol* 42(s218):95–109
- Babjuk M, Böhle A, Burger M et al (2016) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update. *Eur Urol* 71:447–461
- Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE (2016) The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part B: prostate and bladder tumours. *Eur Urol* 70:106–119
- Cheng L, Zhang S, Davidson D, MacLennan G, Koch M, Montironi R, Lopez-Beltran A (2009) Molecular determinants of tumor recurrence in the urinary bladder. *Future Oncol* 5:843–857
- Choi W, Ochoa A, McConkey DJ et al (2017) Genetic alterations in the molecular subtypes of bladder cancer: illustration in the cancer genome atlas dataset. *Eur Urol* 72:354–365
- Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK (2012) Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *PNAS* 109:2078–2083
- Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, Guo CC, Dinney C, Cogdell DE, Zhang S, Lee S, Lee JG, Weinstein JN, Baggerly K, McConkey D, Czerniak B (2016) Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine* 12:105–117
- Kamat AM, Hahn NM, Elfstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, Guo CC, Lotan Y, Kassouf W (2016) Bladder cancer. *Lancet* 388(10061):2796–2810
- McConkey DJ, Choi W, Ochoa A, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CPN (2015) Therapeutic opportunities in the intrinsic subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 29:377–394
- Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, McConkey DJ (2014) Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 11:400–410
- Czerniak B, Dinney C, McConkey D (2016) Origins of bladder cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 11:149–174
- Dyrskjot L, Zieger K, Real FX, Malats N, Carrato A, Hurst C, Kotwal S, Knowles M, Malmstrom PU, de la Torre M, Wester K, Allory Y, Vordos D, Caillaud A, Radvanyi F, Hein AMK, Jensen JL, Jensen KME, Marcussen N, Orntoft TF (2007) Gene expression signatures predict outcome in non-muscle-invasive bladder carcinoma: a multicenter validation study. *Clin Cancer Res* 13:3545–3551
- Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Hoyer S, Ulhøi BP, Vang S, Reinert T, Hermann GG, Mogensen K, Thomsen MBH, Nielsen MM, Marquez M, Segersten U, Aine M, Höglund M, Birkenkamp-Demtröder K, Frisrup N, Borre M, Hartmann A, Stöhr R, Wach S, Keck B, Seitz AK, Nawroth R, Maurer T, Tulic C, Simic T, Junker K, Horstmann M, Harving N, Petersen AC, Calle ML, Steyerberg EW, Beukers W, van Kessel KEM, Jensen JB, Pedersen JS, Malmström PU, Malats N, Real FX, Zwarthoff EC, Ørntoft TF, Dyrskjot L (2016) Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma. *Cancer Cell* 30:27–42
- Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K et al (2012) A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 18:3377–3386
- Sjödahl G, Lövgren K, Lauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, Aine M, Eriksson P, Månsson W, Lindgren D, Fernö M, Liedberg F, Höglund M (2013) Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 183:681–691
- Patschan O, Sjödahl G, Chebil G et al (2015) A molecular pathologic framework for risk stratification of stage T1 urothelial carcinoma. *Eur Urol* 68:824–832
- Dhawan D, Paoloni M, Shukradas S et al (2015) Comparative gene expression analyses identify luminal and basal subtypes of canine invasive urothelial carcinoma that mimic patterns in human invasive bladder cancer. *PLoS One* 10:1–15
- McConkey DJ, Choi W, Shen Y et al (2016) A prognostic gene expression signature in the molecular classification of chemotherapy-naïve urothelial cancer is predictive of clinical outcomes from neoadjuvant chemotherapy: a phase 2 trial of dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin. *Eur Urol* 69:855–862

25. Sikic D, Keck B, Wach S et al (2017) Immunohistochemical subtyping using CK20 and CK5 can identify urothelial carcinomas of the upper urinary tract with a poor prognosis. *PLoS One* 12:1–13
26. McConkey DJ, Choi W. (2018) Molecular subtypes of bladder cancer. *Curr Oncol Rep* 2018 20(10):77. doi: <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0727-5>
27. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA et al (2017) Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim* 3:1–19
28. Kim J, Akbani R, Creighton CJ, Lerner SP, Weinstein JN, Getz G, Kwiatkowski DJ (2015) Invasive bladder cancer: genomic insights and therapeutic promise. *Clin Cancer Res* 21:4514–4524
29. McConkey DJ, Choi W, Ochoa A, Dinney CPN (2016) Intrinsic subtypes and bladder cancer metastasis. *Asian J Urol* 3:260–267
30. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY (2014) Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *PNAS* 111:3110–3115
31. Ochoa AE, Choi W, Su X, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney C, McConkey D (2016) Specific micro-RNA expression patterns distinguish the basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget* 7:80164–80174
32. McConkey DJ, Choi W, Dinney CPN (2014) New insights into subtypes of invasive bladder cancer: considerations of the clinician. *Eur Urol* 66:609–610
33. Rebouissou S, Bernard-pierrot I, De RA et al (2014) EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* 6(244): 244ra91. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008970>
34. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CPN, McConkey DJ (2014) Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 25:152–165
35. Weinstein JN, Akbani R, Broom BM et al (2014) Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Cancer genome atlas research network. Nature* 507:315–322
36. Sjö Dahl G, Jackson Chelsea L, Bartlett J, Robert SD, Berman David M (2019) Molecular profiling in muscle invasive bladder cancer: more than the sum of its parts. *J Pathol* 247:563–573. <https://doi.org/10.1002/path.5230>
37. Guo CC, Czerniak B (2019) Bladder cancer in the genomic era. *Arch Pathol Lab Med Jan* 23 143:695–704. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0329-RA>
38. Dyrskjot L (2018) Molecular subtypes of bladder cancer: academic exercise or clinical relevance? *Eur Urol* 75:433–434. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.006>
39. Tan TZ, Rouanne M, Tan KT, Huang RY, Thiery J (2018) Molecular subtypes of urothelial bladder cancer: results from a meta-cohort analysis of 2411 tumors. *Eur Urol*. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.027>
40. Breyer J, Wirtz RM, Otto W et al (2017) In stage pT1 nonmuscle-invasive bladder cancer (NMIBC), high KRT20 and low KRT5 mRNA expression identify the luminal subtype and predict recurrence and survival. *Virchows Arch* 470:267–274
41. Warrick JI, Sjö Dahl G, Kaag M, Raman JD, Merrill S, Shuman L, Chen G, Walter V, DeGraff DJ (2019) Intratumoral heterogeneity of bladder cancer by molecular subtypes and histologic variants. *Eur Urol* 75:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.003> Epub 2018 Sep 25
42. Lopez-Beltran A, Henriques V, Montironi R, Cimadamore A, Raspollini MR, Cheng L (2019) Variants and new entities of bladder cancer. *Histopathology* 74:77–96

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Fundação Champalimaud

Comissão de Ética

Prof. Doutor João Lobo Antunes (Presidente)
Prof. Doutor Jorge Soares (Vice-Presidente)
Prof. Doutor Adelino Cardoso
Prof. Doutor António Jacinto
Prof. Doutor José Cunha Vaz
Dr. Mário Miguel Rosa
Dra. Paula Martinho da Silva

Lisboa, 27 de Julho de 2016

Projeto Investigação: Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no tumor vesical não músculo-invasivo
Investigador Principal: Dr. Jorge Rebola.

Tendo em conta, conforme parecer da Dra Paula Martinho anexo, que o projeto envolverá apenas doentes do Centro Clínico Champalimaud que não obterão qualquer retribuição por participação no estudo, após análise dos documentos que servem de base à candidatura, a Comissão de Ética aprovou este projeto.

O Vice-Presidente da Comissão de Ética,

Professor Doutor Jorge Soares, M.D., Ph.D.

Fundação D. Anna de Sommer Champalimaud e
Dr. Carlos Montez Champalimaud
Fundada por António Champalimaud

Avenida Brasília
1400-038 Lisboa, Portugal
T (+351) 210 480 200
F (+351) 210 480 299
www.fchampalimaud.org



Autorização n.º 12757/ 2016

Fundação D. Anna de Sommer Champalimaud e Dr. Carlos Montez Champalimaud , NIPC 507131827, notificou à Comissão Nacional de Protecção de Dados (CNPd) um tratamento de dados pessoais com a finalidade de realizar um Estudo Clínico sem Intervenção, denominado Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no tumor vesical não músculo-invasivo .

O participante é identificado por um código especificamente criado para este estudo, constituído de modo a não permitir a imediata identificação do titular dos dados; designadamente, não são utilizados códigos que coincidam com os números de identificação, iniciais do nome, data de nascimento, número de telefone, ou resultem de uma composição simples desse tipo de dados. A chave da codificação só é conhecida do(s) investigador(es).

É recolhido o consentimento expresso do participante ou do seu representante legal.

A informação é recolhida diretamente do titular e indiretamente do processo clínico.

As eventuais transmissões de informação são efetuadas por referência ao código do participante, sendo, nessa medida, anónimas para o destinatário.

A CNPD já se pronunciou na Deliberação n.º 1704/2015 sobre o enquadramento legal, os fundamentos de legitimidade, os princípios aplicáveis para o correto cumprimento da Lei n.º 67/98, de 26 de outubro, alterada pela Lei n.º 103/2015, de 24 de agosto, doravante LPD, bem como sobre as condições e limites aplicáveis ao tratamento de dados efetuados para a finalidade de investigação clínica.

No caso em apreço, o tratamento objeto da notificação enquadra-se no âmbito daquela deliberação e o responsável declara expressamente que cumpre os limites e condições aplicáveis por força da LPD e da Lei n.º 21/2014, de 16 de abril, alterada pela Lei n.º 73/2015, de 27 de junho – Lei da Investigação Clínica –, explicitados na Deliberação n.º 1704/2015.

O fundamento de legitimidade é o consentimento do titular.



A informação tratada é recolhida de forma lícita, para finalidade determinada, explícita e legítima e não é excessiva – cf. alíneas a), b) e c) do n.º 1 do artigo 5.º da LPD.

Assim, nos termos das disposições conjugadas do n.º 2 do artigo 7.º, da alínea a) do n.º 1 do artigo 28.º e do artigo 30.º da LPD, bem como do n.º 3 do artigo 1.º e do n.º 9 do artigo 16.º ambos da Lei de Investigação Clínica, com as condições e limites explicitados na Deliberação da CNPD n.º 1704/2015, que aqui se dão por reproduzidos, autoriza-se o presente tratamento de dados pessoais nos seguintes termos:

Responsável – Fundação D. Anna de Sommer Champalimaud e Dr. Carlos Montez Champalimaud

Finalidade – Estudo Clínico sem Intervenção, denominado Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no tumor vesical não musculo-invasivo

Categoria de dados pessoais tratados – Código do participante; idade/data de nascimento; género; dados da história clínica; dados de meios complementares de diagnóstico; genéticos

Exercício do direito de acesso – Através dos investigadores, por escrito

Comunicações, interconexões e fluxos transfronteiriços de dados pessoais identificáveis no destinatário – Não existem

Prazo máximo de conservação dos dados – A chave que produziu o código que permite a identificação indireta do titular dos dados deve ser eliminada 5 anos após o fim do estudo.

Da LPD e da Lei de investigação Clínica, nos termos e condições fixados na presente Autorização e desenvolvidos na Deliberação da CNPD n.º 1704/2015, resultam obrigações que o responsável tem de cumprir. Destas deve dar conhecimento a todos os que intervenham no tratamento de dados pessoais.

Lisboa, 30-11-2016



A Presidente

Filipa Calvão

Proc. n.º 18782/ 2016 | 3



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

**Dpto. de Especialidades
Médico - Quirúrgicas**

Facultad de Medicina
e-mail: emirupes@uco.es

Avda. Menéndez Pidal, s/n.
Teléfonos: 957 21 82 48
957 21 83 00
Fax: 957 21 82 48
14004-CÓRDOBA (España)

**INFORMACIÓN PARA EL CONSEJO DE ETICA
DE LA FUNDACIÓN CHAMAPALIMAUD DE LISBOA**

La base de datos proporcionada por la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, para el estudio "APLICACIÓN CLÍNICA DE BIOMARCADORES EN EL CARCINOMA UROTELIAL NO MUSCULO-INVASIVO", a realizar por el Dr. Jorge Manuel Trindade Rebola, médico urólogo de la Fundación Champalimaud de Lisboa y estudiante de Doctorado en la Escuela Nacional de Salud Pública de la Universidad Nova de Lisboa, es una base de datos anonimizada de pacientes con el diagnóstico de carcinoma urotelial de vejiga no musculo-invasivo que incluye la información referente a edad, sexo, diagnóstico histológico, expresión de biomarcadores moleculares en el tejido tumoral, así como, presencia o no de recidiva, progresión o muerte cáncer específica con un periodo de observación de 120 meses.

Esta base de datos anonimizada resulta de proyectos de investigación realizados con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía en Córdoba.

Prof. Dr. Antonio López-Beltrán

28 de Septiembre 2018



Fundação Champalimaud

Comissão de Ética

Prof. Doutor José Manuel Cardoso da Costa (Presidente)
Prof. Doutor Adelino Cardoso
Prof. Doutor António Jacinto
Prof. Doutor José Cunha Vaz
Prof^a. Doutora Leonor Parreira
Prof. Doutor Mário Miguel Rosa
Dra. Paula Martinho da Silva

Lisboa, 17 de outubro de 2018

Projeto: Tese de doutoramento Dr. Jorge Rebola. "Aplicação Clínica de biomarcadores moleculares no carcinoma urotelial da bexiga não musculo-invasivo."

Uma vez que não foi incluído nenhum doente da Fundação Champalimaud no estudo, o Consentimento Informado não foi utilizado. Não há, assim, lugar à necessidade de dispensa do mesmo, não apresentando o projeto quaisquer objeções éticas.

O Presidente da Comissão de Ética,
The President of the Ethics Committee,

Prof. Dr. José Manuel Cardoso da Costa, J.D.

Fundação D. Anna de Sommer Champalimaud e
Dr. Carlos Montez Champalimaud
Fundada por António Champalimaud

Avenida Brasília
1400-038 Lisboa, Portugal
T (+351) 210 480 200
F (+351) 210 480 299
www.fchampalimaud.org

